



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ISAAC DE ARAUJO MATOS

PLANEJAMENTO *IN SILICO* DE INIBIDORES DA ENZIMA
DIHIDROFOLATO REDUTASE

DRUG DESIGN IN SILICO OF DIHYDROFOLATE REDUCTASE
INHIBITORS





UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ISAAC DE ARAUJO MATOS

**PLANEJAMENTO *IN SILICO* DE INIBIDORES DA ENZIMA
DIHIDROFOLATO REDUTASE**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Química, da Universidade Federal de
Sergipe, para a obtenção do título de
Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Nivan Bezerra da Costa Júnior

***DRUG DESIGN IN SILICO OF DIHYDROFOLATE REDUCTASE
INHIBITORS***

*Dissertation presented to the
Graduate Programm in Chemistry of
the Federal University of Sergipe to
obtain MSc. in Chemistry.*



**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

M433p

Matos, Isaac de Araujo

Planejamento *in silico* de inibidores da enzima dihidrofolato redutase = Drug design *in silico* of dihydrofolate reductase inhibitors / Isaac de Araujo Matos ; orientador Nivan Bezerra da Costa Júnior. – São Cristóvão, 2016.

138 f. : il.

Dissertação (mestrado em Química) –Universidade Federal de Sergipe, 2014.

1. Química. 2. *S. aureus*. 3. Inibidores. 4. Dihidrofolato redutase
5. Diaminoquinazolinás. 6. Metabolismo do folato. 7. Docagem molecular. I. Costa, Emmanoel Vilaça, orient. II. Título

CDU: 547.59



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SERGIPE

Programa de Pós-graduação em
Química - PPGQ



FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Dissertação
de Mestrado de Isaac de Araujo Matos apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em Química da
Universidade Federal de Sergipe em 29/02/2016.

Prof. Dr. Nivan Bezerra da Costa Junior
Departamento de Química-UFS

Prof. Dr. Valeria Regina de Souza Moraes
Departamento de Química - UFS

Prof. Dr. Roberto Dias Lins Neto
Departamento de Virologia - FIOCRUZ

RESUMO

A inibição do metabolismo do folato é uma importante estratégia no tratamento de doenças infecciosas. No metabolismo do folato, a enzima diidrofolato redutase (DHFR) catalisa a redução do diidrofolato a tetraidrofolato. Este metabólito é essencial para a biossíntese de DNA e proteínas. Portanto, o desenvolvimento de novos antagonistas da diidrofolato redutase tem sido considerado como uma boa estratégia para melhorar o tratamento das doenças infecciosas. No presente trabalho, foi desenvolvido uma relação estrutura-atividade a partir de 17 diaminoquinazolinas inibidoras da DHFR do *Staphylococcus aureus* (SaDHFR) empregando para isso, a regressão linear múltipla. Sete inibidores, não incluídos no grupo treino foram usados para validar o modelo de QSAR. Em adição, docagem molecular foi empregada para avaliar o reconhecimento molecular entre a SaDHFR e a série de diaminoquinazolinas. Além disso, os perfis farmacocinéticos e toxicológicos teóricos foram avaliados para os ligantes mais potentes. Os resultados obtidos por docagem molecular sugerem que as interações hidrofóbicas entre os ligantes e os resíduos Ile51, Phe93, Leu55, Val32 e Leu29, são importantes para a potência dos ligantes. O modelo de QSAR desenvolvido apresentou valores de R^2_{treino} , Q^2 e R^2_{pred} igual a 0.90, 0.90 e 0.65, respectivamente. Os descritores incluídos no modelo, indicam a importância do pK_a e da refratividade para a atividade biológica. Os análogos 28A-12, 28A-13 e 28A-21 exibem um perfil farmacodinâmico, farmacocinético e toxicológico favorável. Os resultados obtidos por meio de diferentes abordagens computacionais podem ser úteis no planejamento de novos fármacos antimicrobianos mais potentes e com menos efeitos colaterais.

Palavras-chave: Inibidores, diidrofolato redutase, *S. aureus*, diaminoquinazolinas, docagem molecular, metabolismo do folato.

ABSTRACT

Inhibition of the folate metabolism is an important strategy in the treatment of infectious diseases. In the folate metabolism, the dihydrofolate reductase (DHFR) catalyses the reduction of dihydrofolate to tetrahydrofolate. This metabolite is essential for the synthesis of DNA and proteins. Therefore, developing new dihydrofolate reductase antagonist has been considered as a good strategy to improve infectious diseases treatment. In this work, a quantitative study of structure-activity relationship of 17 diaminonazolines inhibitors of the Staphylococcus aureus DHFR (SaDHFR), were performed by using multiple linear regression. Seven inhibitors, not included in the training group, were used to validate the QSAR model. In addition, molecular docking was used to study molecular recognition between SaDHFR and diaminoquinazolines derivatives. Moreover, theoretical pharmacokinetics and toxicological profile was determined for the most potent ligands. The molecular docking study suggest that hydrophobic interactions between the ligand and the residues Ile51, Phe93, Leu55, Val32 and Leu29, are important for potency. The model of QSAR generated values of R^2_{training} , Q^2 and R^2_{pred} equal to 0.90, 0.90 and 0.65, respectively. The descriptors included in the model, indicate the importance of pK_a and molar refractivity biological activity. The analogs 28A-12, 28A-13 e 28A-21 exhibit a favorable theoretical pharmacodynamics, pharmacokinetics and toxicological profile. The results obtained for different computational approaches, may be useful in design of new antimicrobial drugs more potent and with few side effects.

Keywords: *Inhibitors, dihydrofolate reductase, S. aureus, diaminoquinazolines, molecular docking, folate metabolism.*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Quimioterapia e resistência antimicrobiana	2
1.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	4
1.3. O metabolismo do folato.....	6
1.4. Dihidrofolato redutase (DHFR)	11
1.4.1. Estrutura	11
1.4.2. Mecanismo catalítico	12
1.4.3. Inibidores da DHFR	14
1.5. Planejamento <i>in silico</i> de fármacos	18
1.5.1. Mecânica molecular	18
1.5.2. Mecânica quântica	20
1.5.3. Docagem molecular	23
1.5.4. Relação quantitativa entre estrutura e atividade.....	30
1.5.5. Estudo in silico das propriedades ADME/Tox.....	34
1.5.6. Planejamento de fármacos baseado em alvos moleculares	42
2. OBJETIVOS.....	47
2.1. Objetivo Geral	47
2.2. Objetivos Específicos	47
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	48
3.1. Parte I – Docagem molecular	48
3.1.1. Análise dos aminoácidos flexíveis e do encaixe induzido.....	48
3.1.2. Preparo do receptor	48
3.1.3. Obtenção e preparo dos ligantes	48
3.1.4. Redocagem molecular	51
3.1.5. Simulações de docagem molecular.....	51
3.2. Parte II –QSAR.....	52
3.2.1. Dados enzimáticos.....	52
3.2.2. Grupos treino e teste	53
3.2.3. Cálculo e seleção dos descritores.....	53
3.2.4. Construção e validação do modelo	54
3.3. Parte III – Perfil ADME/Tox.....	54
3.3.1. Perfil farmacocinético teórico	54
3.3.2. Perfil toxicológico teórico	54
3.3.3. Análise de similaridade	55
3.4. Parte IV – Proposição de novos compostos	55

3.4.1. Modificações estruturais	55
3.4.2. Análise dos análogos propostos	55
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	56
4.1. Parte I – Docagem molecular	56
4.1.1. Análise dos aminoácidos flexíveis e do encaixe induzido.....	56
4.1.2. Redocagem molecular	60
4.1.3. Simulações de docagem molecular.....	61
4.2. Parte II – QSAR	72
4.2.1. Análise titulométrica teórica	72
4.2.2. Modelo	74
4.2.3. Validação	77
4.3. Parte III – Perfil ADME/Tox	81
4.3.1. Perfil farmacocinético teórico	81
4.3.2. Perfil toxicológico teórico	83
4.3.3. Análise de similaridade	86
4.5. Parte IV – Proposição de novos compostos.....	88
4.5.1. Modificações estruturais	88
4.5.2. Análise dos análogos propostos	90
5. CONCLUSÕES.....	95
6. REFERÊNCIAS.....	97

“Essencialmente, todos os modelos estão errados, mas alguns são úteis”
(George Box)

AGRADECIMENTOS

A Deus, o grande Químico, por ter me proporcionado a vida.

A Universidade Federal de Sergipe.

Ao Departamento de Química da Universidade Federal de Química por proporcionar a estrutura requerida para o desenvolvimento do trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Química.

Ao meu orientador Professor Dr. Nivan Bezerra da Costa Júnior, pela oportunidade e confiança.

Aos integrantes do laboratório Pople pela valiosa ajuda e todo o aprendizado.

À CAPES, pelo fomento da bolsa.

A minha família, pelo amor, carinho, incentivo e apoio.

A todos, muito obrigado.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ADME – Administração, distribuição, metabolização e excreção
- AdoMet – S-adenosilmetionina
- AICARFT – 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleotídeo formil transferase
- AMP – Monofosfato de adenosina
- CA-MRSA – *S. aureus* resistente à metilicina adquirido na comunidade
- DFT – Teoria do funcional de densidade
- DHF – Dihidrofolato
- DHFR – Dihidrofolato redutase
- DHFS – Dihidrofolato sintase
- DHNA – Dihidroneopterinina aldolase
- DHNTase – Dihidroneopterinina hidrolase
- DHPS – Dihidropteroato sintase
- DNA – Ácido desoxirribonucléico
- dTMP – 2-desoxitimidinamonofofato
- dUMP – 2-desoxiuridinamonofofato
- eSHMT – Serina hidroximetiltransferase
- GARFT – Glicinamida ribonucleotídeo formil transferase
- GMP – Monofosfato de guanosina
- GTP-CH – Guanina ciclohidrolase
- hDHFR – Dihidrofolato redutase humana
- HPPK – Hidroximetildiidropteridina pirofosfoquinase
- HTS – Triagem biológica automatizada em larga escala
- IC₅₀ – Concentração necessária para inibir 50% da atividade
- IMP – Inosina 5'-monofosfato

- K_i – Constante de inibição
- logP – Logaritmo do coeficiente de partição octanol-água
- MIC – Concentração inibitória mínima
- MRL – *Multiple linear regression*
- MS – Metionina sintase
- mSHMT – Serina hidroximetil transferase mitocondrial
- NADP⁺ – Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidado
- NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
- OMS – Organização mundial da saúde
- PABA – Tetraidrofolato
- PCR – *Principal component regression*
- PDB – *Protein Data Bank*
- P_i – Fosfato
- PRPP – 5-fosfato- α -D-ribosil-1-pirofosfato
- QSAR – Relação quantitativa estrutura-atividade
- RMSD – *Root-mean-square deviation*
- SaDHFR – Dihidrofolato redutase do *S. aureus*
- SARM – *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina
- TPSA – Área superficial polar 2D
- TS – Timidilato sintase
- 10-CHO-THF – 10-formiltetraidrofolato
- 5,10-CH₂-THF – 5,10-metilenotetraidrofolato
- 5-CH₂-THF – 5-metiltetraidrofolato

1. INTRODUÇÃO

O processo responsável pelo desenvolvimento de novos fármacos caracteriza-se por ser oneroso, lento e arriscado do ponto de vista do investimento aplicado, demorando de 10 a 15 anos e com custos que variam de 897 milhões de dólares a até 1,9 bilhão de dólares^{1, 2}.

Com o intuito de obter sucesso no desenvolvimento de novos fármacos, métodos de planejamento assistido por computador (*in silico*) tem sido empregados, pois fornecem importantes informações sobre dados experimentais e mecanismo de ação, além de poder sugerir estruturas moleculares antes mesmo de sua síntese, ajudando desta forma na tomada de decisões de custo-benefício³.

Diversos métodos computacionais são empregados no planejamento de novos fármacos, como a docagem molecular, a triagem virtual, mapas farmacofóricos e QSAR (relação quantitativa estrutura-atividade)¹. Uma das vantagens destes métodos é que suportam um grande número de compostos a serem testados e exigem uma infraestrutura mais simples quando comparados aos métodos tradicionais que buscam compostos bioativos⁴. Um dos melhores exemplos onde o planejamento racional obteve êxito no desenvolvimento de novos fármacos fora na descoberta dos inibidores da HIV protease e do Imatinib (Gleevec®), um antineoplásico empregado no tratamento da leucemia mielogênica crônica^{5, 6}.

O presente estudo consiste no emprego de vários métodos de planejamento de fármacos assistido por computador para a melhor compreensão do processo de reconhecimento molecular entre uma série de análogos diaminoquinazolínicos e a enzima diidrofolato redutase do *Staphylococcus aureus*, uma bactéria que adquiriu resistência a diversos antimicrobianos e que hoje é um importante patógeno responsável por infecções hospitalares e que pode também ser adquirida em ambiente não hospitalar.

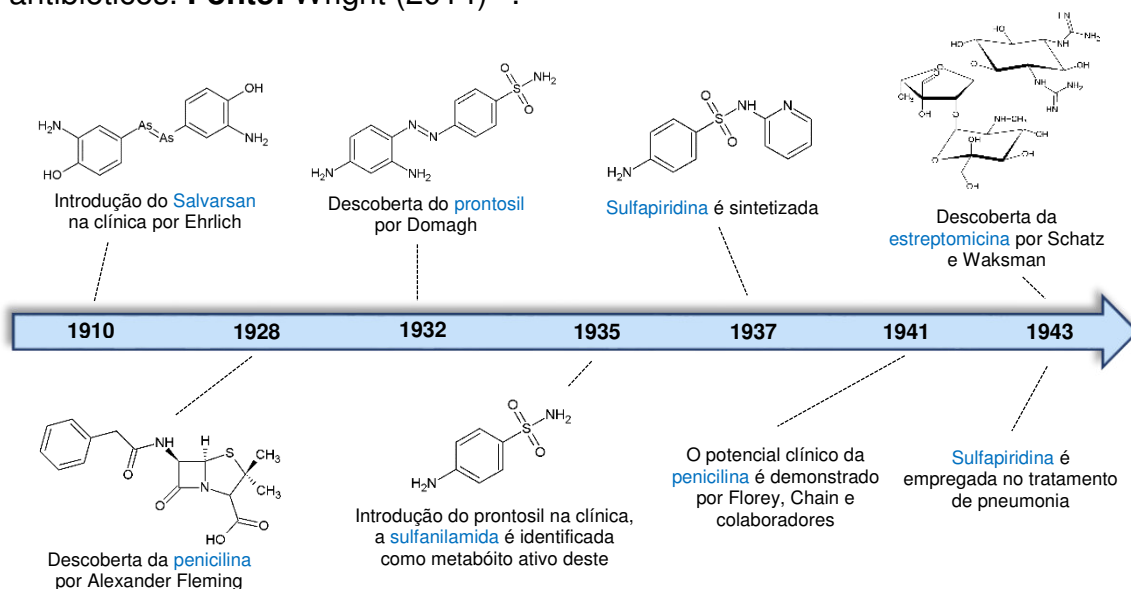
Segue uma descrição das origens da quimioterapia antimicrobiana, a importância clínica do *Staphylococcus aureus*, a enzima alvo deste trabalho (a diidrofolato redutase), seus inibidores e alguns métodos computacionais empregados no planejamento de fármacos.

1.1. Quimioterapia e resistência antimicrobiana

Dentre os maiores avanços da medicina moderna, o desenvolvimento de compostos antimicrobianos merece grande destaque visto que, inúmeras doenças antes consideradas letais hoje são passíveis de tratamento ou cura com simples esquemas terapêuticos que consistem na administração de apenas alguns comprimidos ao dia⁷.

Estes avanços tiveram como trabalhos pioneiros o do bacteriólogo alemão Paul Ehrlich, que em 1910 (Figura 1), introduziu na clínica o 3-amino-4-hidroxifenilarsênico(I) (salvarsan ou arsfenamina) no combate ao *Treponema pallidum*, agente causador da sífilis, sendo considerado o marco da quimioterapia antimicrobiana dirigida⁸. Porém, a descoberta da penicilina em 1928 pelo bacteriologista Alexander Fleming mudou o curso tratamento das infecções bacterianas, uma vez que este fora o primeiro antibiótico de sucesso, abrindo caminho para uma classe de antibióticos que interfeririam na biossíntese da parede celular bacteriana⁹.

Figura 1. Evolução cronológica da descoberta e desenvolvimento dos primeiros antibióticos. **Fonte:** Wright (2014)¹⁰.



Após a descoberta da penicilina, a busca por novos antimicrobianos estendeu-se a compostos sintéticos. Os trabalhos de Domagk com o corante vermelho prontosil, demonstraram efeitos curativos deste azo composto quando injetado em ratos submetidos a doses letais de estreptococos, sendo mais tarde atribuída esta atividade à sulfanilamida, um metabólito do prontosil gerado por ativação metabólica¹⁰.

A busca por análogos mais potentes que a sulfanilamida culminou na descoberta da sulfapiridina em 1937, que demonstrou-se não apenas mais potente que a sulfanilamida como também com um espectro antimicrobiano mais amplo, sendo eficaz contra meningococos, gonococos e outras bactérias¹¹. Porém seu uso clínico só fora realizado em 1943, no tratamento da pneumonia¹⁰.

Após a descoberta da sulfapiridina estudos mais completos sobre a penicilina foram realizados, revelando seu potencial clínico em 1941 através dos trabalhos de Chain e Florey¹². No mesmo ano do uso clínico da sulfapiridina, um novo metabólito microbiano com propriedades antibióticas fora descoberto, a estreptomicina, isolada do microrganismo *Streptomyces griseus* por Albert Schatz¹⁰.

O termo quimioterapia designado por Ehrlich, inicialmente aplicado ao uso de substâncias sintéticas no combate a agentes infecciosos fora recentemente ampliado para englobar os antibióticos, metabólitos secundários produzidos por alguns microrganismos que afetam o desenvolvimento de outros microrganismos, além das substâncias sintetizadas por químicos medicinais¹³.

As ações potentes e específicas observadas nos antimicrobianos são resultado de sua capacidade de interferir em alvos moleculares existentes apenas nos microrganismos, ou que possuam menor importância no metabolismo dos seres humanos⁷. Dentre esses alvos moleculares podemos citar as enzimas que compõem a maquinaria de biossíntese de nucleotídeos e da replicação do DNA, as enzimas responsáveis pela síntese proteica e pelos constituintes da parede celular¹⁴.

Se por um lado a descoberta dos antibióticos nos últimos dois séculos representou um grande avanço na saúde e na longevidade dos seres humanos, o uso destes trouxe à tona gerações de microrganismos resistentes as mais diferentes classes de antibióticos¹⁵. Entre as diversas espécies de bactérias que adquiriram resistência estão cepas de *Escherichia coli*, *Streptococcus*

pneumoniae, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Staphylococcus aureus*¹⁶⁻¹⁹. O reservatório dessas cepas resistentes descentralizou-se do ambiente hospitalar e hoje já são encontradas bactérias resistentes nas mãos de manipuladores de alimentos, em alimentos derivados de carne prontos para o consumo e em fazendas de criação de suínos para corte^{16, 20, 21}.

Apesar da existência de um grande arsenal terapêutico de antibacterianos, incluindo as classes químicas sulfonamidas, diaminopirimidinas, quinolonas, betalactâmicos, tetraciclinas, derivados nitrobenzênicos, aminoglicosídeos, macrolídeos, polipeptídeos, glicopeptídeos, oxazolidona, nitrofurânicos, nitroimidazóis e derivados do ácido nicotínico, os microrganismos adquiriram resistências as mais diversas classes químicas, através de mecanismos que incluem: mutações nos alvos moleculares aos quais o fármaco atua, inativação enzimática, impermeabilização e expressão de bombas de efluxo^{22, 23}.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) em seu relatório de 2014, alertou que cada vez mais tratar simples infecções causadas por fungos, bactérias, vírus e parasitas está se tornando mais difícil, devido à resistência a compostos antimicrobianos, e que uma era pós-antibiótico, onde o controle de uma simples infecção em um ferimento não será factível, não está distante, sendo este panorama uma possibilidade para o século XXI²⁴.

1.2. *Staphylococcus aureus*

Dentre as diversas espécies de microrganismos resistentes destaca-se o *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), um coco Gram-positivo que coloniza a pele e as fossas nasais, podendo desencadear desde processos patológicos simples como espinhas e furúnculos, a graves doenças como septicemia e pneumonia²⁵. A designação “aureus” da espécie, está relacionada com o fato de que as colônias de *S. aureus* apresentam coloração amarelo bronze, diferentemente das demais espécies que são esbranquiçadas¹⁵.

Na década de 40 as principais infecções hospitalares eram causadas por cepas de *Staphylococcus* inicialmente sensíveis à penicilina, porém em 1950 a resistência a penicilina já era detectada em isolados de *S. aureus*²⁶. Para

contornar este problema, novos antibióticos foram desenvolvidos, dentre eles a meticilina, uma penicilina sintética resistente a hidrólise por beta-lactamases²⁷. A resistência do *S. aureus* não fora exclusiva à penicilina, pois logo após a introdução da meticilina, cepas resistentes a este último fármaco foram isoladas²⁸. Estas cepas resistentes à meticilina e a todos os outros beta-lactâmicos receberam a denominação de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (SARM)²⁷.

Com a resistência aos beta-lactâmicos, a vancomicina passou a ser empregada como uma das alternativas no combate a infecções causadas por SARM²⁹. Porém, a resistência à vancomicina tem sido reportada, e a essas novas cepas é atribuída a denominação de *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina (SARV)³⁰⁻³².

Inicialmente as infecções associadas ao *S. aureus* estavam relacionadas ao ambiente hospitalar porém, a natureza nosocomial destas infecções expandiu-se e hoje é crescente o número de casos de infecções por SARM adquiridos na comunidade (CA-SARM)³³. Os critérios que diferenciam as infecções associadas à comunidade da infecção hospitalar incluem: diagnóstico de SARM em um prazo máximo de 48 horas após a entrada no hospital, ausência de infecção prévia por SARM, além do que o paciente não pode ter sido submetido no último ano a hospitalização, admissão em instituições para cuidado, submissão à diálise, cirurgia e não possua ou foram submetidos à cateteres ou dispositivos percutâneos³⁴.

Dentre os agentes farmacológicos usados atualmente no tratamento da SARM encontra-se a muricina, um antimicrobiano de uso tópico, a tetraciclina, rifampicina, e a combinação sulfametoxazol-trimetoprim, empregados pela via oral, a clindamicina e linezolida, ambos disponíveis em formulações para uso oral e intravenoso e os agentes intravenosos vancomicina, teicoplanina, tigeciclina, daptomicina e quinupristina-dalfopristina³⁵. Apesar do número razoável de fármacos disponíveis para o tratamento de infecções por SARM, a resistência a cada um deles já fora reportada³⁶⁻⁴⁹.

Dados provenientes da OMS confirmam que a resistência do *S. aureus* é um problema de saúde global, com focos na África, Europa, Américas, Sudeste da Ásia, região do Mediterrâneo Oriental e do Pacífico Ocidental²⁴. A maioria dos países pesquisados estão com proporções de SARM superior a 20%, podendo

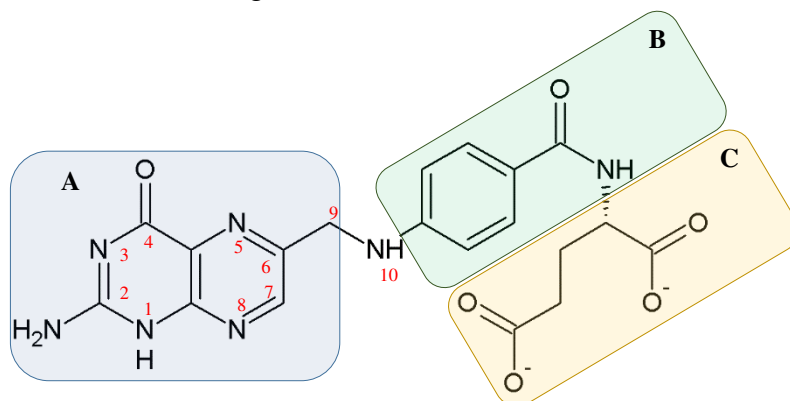
chegar a 80% das cepas de *S. aureus* resistentes em alguns relatórios, o que gera a necessidade de tratamentos mais onerosos com fármacos de segunda linha, mais tóxicos²⁴.

1.3. O metabolismo do folato

O importante papel dos folatos para a saúde humana tem sido evidenciado nas últimas décadas, demonstrando-se essencial para a biossíntese do DNA, a neurotransmissão e participação no metabolismo dos aminoácidos, com consequências na divisão celular, funções neurológicas e crescimento^{50, 51}. Sua deficiência afeta diversos sistemas orgânicos como o hematológico, ocasionando hipersegmentação dos neutrófilos, com posterior produção de células marrons megaloblásticas, células vermelhas macrocíticas e finalmente anemia macrocítica⁵². O baixo consumo de folato durante a gestação também está relacionado com o aumento de partos prematuros, retardo no crescimento e baixo peso ao nascer⁵².

O folato (ácido fólico ou pteroilglutamato) é uma vitamina hidrossolúvel, com estrutura molecular formada pela subestrutura pterina, conectada a amina do ácido *para*-aminobenzóico (PABA), que por sua vez está ligado ao ácido glutâmico através do seu grupo amino e da carbonila deste aminoácido (Figura 2)⁵³.

Figura 2. Estrutura química do folato e suas subestruturas. **A** – pterina; **B** – ácido *para*-aminobenzóico; **C** – ácido glutâmico.



A porção glutamato do folato pode sofrer polimerização mediada pela enzima folilpoliglutamato sintetase, através da formação de ligações γ -carbonil, formando assim, ácidos fólicos poliglutamatos com até 11 unidades de ácido glutâmico, sendo os folatos de 3 e 5 resíduos os mais abundantes⁵¹.

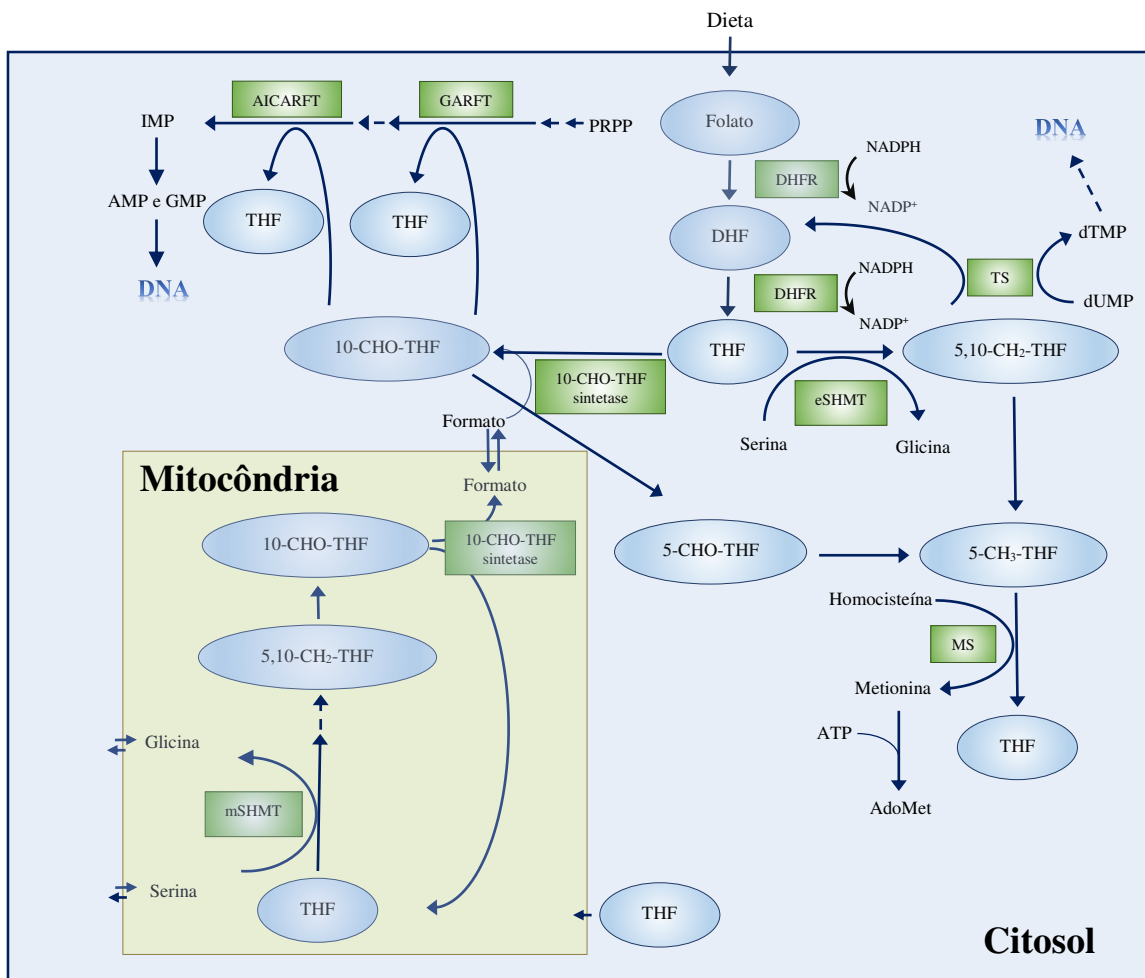
Organismos metazoários, dentre eles os mamíferos, não possuem maquinaria biossintética para a produção de folatos, sendo necessário obtê-los através de uma dieta rica em vegetais verdes⁵⁴. A sua captação pela célula é dependente de transportadores específicos, pois a presença de dois grupos ácido carboxílicos, que em condições fisiológicas encontram-se desprotonados, impede a permeação por difusão passiva⁵⁴.

As reações metabólicas do folato em eucariontes ocorrem em dois compartimentos celulares: no citosol e na mitocôndria (Figura 3)⁵⁵. O papel metabólico do folato é dependente de reduções nos átomos 5, 6, 7 e 8 do anel pteridínico, reduções estas necessárias para a biossíntese do tetraidrofolato (THF)⁵¹. A redução do folato a diidrofolato, e este a tetraidrofolato é catalisada pela enzima diidrofolato redutase no citossol (Figura 3)⁵⁶.

Em seguida, a serina hidroximetil transferase (eSHMT) empregando a serina como fonte doadora de hidroximetila, converte o THF a 5,10-metilenotetraidrofolato (5,10-CH₂-THF) com formação de glicina, sendo o 5,10-CH₂-THF um importante cofator para a metilação da 2-desoxiuridina monofosfato (dUMP), com formação da 2-desoxitimidina monofosfato (dTMP) pela enzima timidilato sintase (TS) (Figura 3)⁵⁴.

Além das reações que levam a síntese de precursores do DNA, o 5,10-CH₂-THF possui um importante papel na regulação do ciclo do tetraidrofolato, podendo ser convertido de forma irreversível pela enzima 5,10-metilenotetraidrofolato redutase a 5-CH₂-THF, um cofator da metionina sintase (MS), a qual juntamente com a vitamina B₁₂ catalisa a conversão da homocisteína em metionina com formação de THF^{54, 57-59}. A metionina pode conjugar-se ao ATP pela ação da AdoMet sintetase formando a S-adenosilmetionina (AdoMet), um doador de metila com importantes funções na expressão e supressão gênica (Figura 3)⁶⁰.

Figura 3. Via metabólica do folato em eucariontes. **Fonte:** Adaptado de Gonen (2012)⁵⁴.



DHFR – diidrofolato redutase; DHF – diidrofolato; NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido; NADP⁺ – nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidado; eSHMT – serina hidroximetil-transferase; TS – timidilato sintase; 5,10-CH₂ – 5,10-metilenotetraidrofolato; dUMP – 2-desoxiuridina monofosfato; dTMP – 2-desoxitimidina monofosfato; DNA – ácido desoxirribonucleico; 5-CH₃-TMF – 5-metiltetraidrofolato; MS – metionina sintase; ATP – adenosina trifosfato; AdoMet – S-adenosilmetionina; 10-CHO-THF – 10-formiltetraidrofolato; 10-CHO-THF sintetase – 10-formiltetraidrofolato sintetase; GARFT – glicinamida ribonucleotídeo formiltransferase; AICARFT – 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleotídeo formiltransferase; IMP – inosina 5'-monofosfato; AMP – monofosfato de adenosina; GMP – monofosfato de guanosina; PRPP – 5-fosfo-α-D-ribosil 1-pirofosfato; mSHMT – serina hidroximetil-transferase mitocondrial.

Outro destino do THF é sua redução pela 10-formiltetraidrofolato sintetase (10-CHO-THF sintetase), com participação do formato, gerando o 10-formiltetraidrofolato (10-CHO-THF), o qual é metabolizado pelas enzimas glicinamida ribonucleotídeo formiltransferase (GARFT) e 5-aminoimidazol-4-

carboxamida ribonucleotídeo formiltransferase (AICARFT), com geração de inosina 5'-monofosfato (IMP), um intermediário purínico essencial a biossíntese de (AMP) e (GMP), metabólitos essenciais para a biossíntese de DNA⁵⁴.

As reações mitocondriais da via do folato incluem a conversão do THF a 5,10-CH₂-THF, agora catalisada pela isoforma mitocondrial da serina hidroximetil-transferase (mSHMT) e a formação do formato pela 10-CHO-THF sintetase empregando o 10-CHO-THF como substrato (Figura 3).

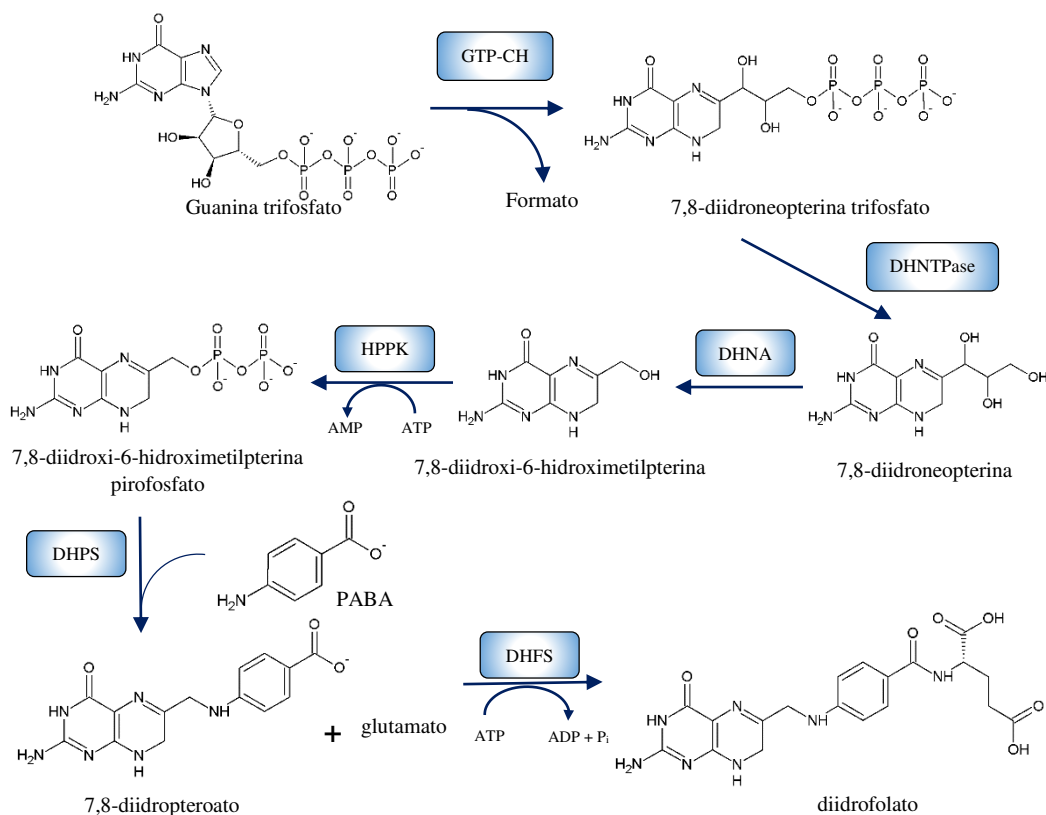
Em organismos eucariontes e procariontes o metabolismo do folato é conservado nas etapas biossintéticas posteriores a ação da DHFR, porém as reações catalíticas anteriores são distintas em ambos⁶¹. Em plantas e microrganismos, a biossíntese de folato inicialmente se dá por meio da ação da Guanina ciclodrolase (GTP-CH), empregando o substrato guanina trifosfato, com formação do intermediário 7,8-diidroneopterina trifosfato (Figura 4). Em seguida a 7,8-diidroneopterina trifosfato sofre hidrólise através da diidroneopterina hidrolase (DHNTPase) convertendo-o em 7,8-diidroneopterina⁶¹.

O passo seguinte na via do folato é a reação catalisada pela diidroneopterina aldolase (DHNA), transformando a 7,8-diidroneopterina em 7,8-diidroxi-6-hidroximetilpterina, que posteriormente será convertido em 7,8-diidroxi-6-hidroximetilpterina pirofosfato em uma reação catalisada pela hidroximetildiidropteridina pirofosfoquinase (HPPK) (Figura 4). Posteriormente, o 7,8-diidroxi-6-hidroximetilpterina pirofosfato sofrerá uma remoção dos grupamentos fosfatos com adição de ácido *para*-aminobenzóico (PABA), por meio da diidropteroato sintase (DHPS), formando o 7,8-diidropteroato⁶².

O último passo da porção não conservada da via do folato é a reação catalisada pela enzima diidrofolato sintase (DHFS), empregando o 7,8-diidropteroato e uma molécula de glutamato, tendo como produto desta reação o diidrofolato (DHF) (Figura 4).

Figura 4. Metabolismo não conservado do folato em plantas e microrganismos.

Fonte: Adaptado de Swarbrick (2008)⁶³.



GTP-CH - guanina ciclodrolase; DHNTPase - diidroneopterina hidrolase; DHNA - diidroneopterina aldolase; HPPK - hidroximetildiidropteridina pirofosfoquinase; DHPS - diidropteroato sintase; DHFS - diidrofolato sintase.

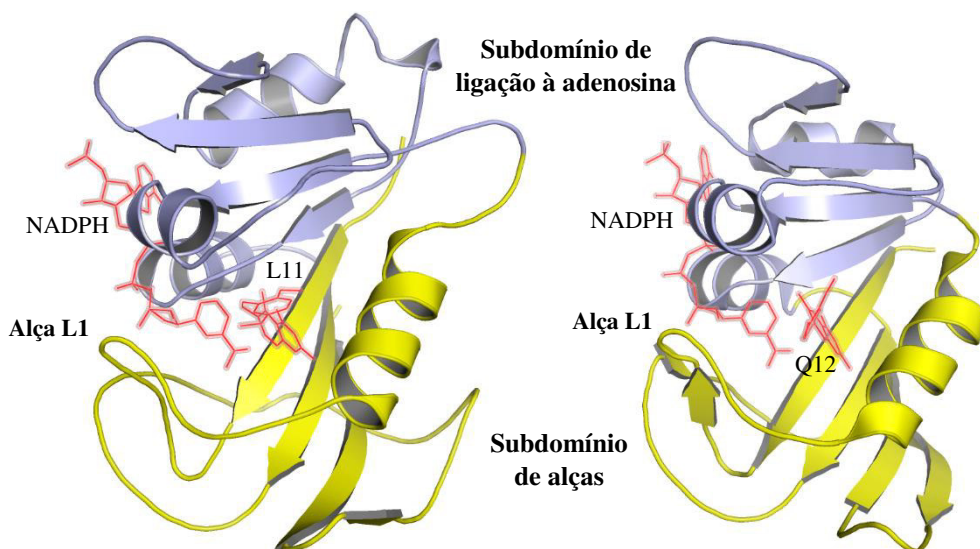
A via do folato tem sido modulada de forma farmacológica no tratamento de diversas doenças como câncer, artrite reumatoide, lúpus eritematoso cutâneo, sarcoidose, malária, toxoplasmose, infecções bacterianas e fúngicas, demonstrando-se, uma via metabólica de grande importância clínica^{54, 64-70}.

1.4. Diidrofolato redutase (DHFR)

1.4.1. Estrutura

A estrutura cristalográfica da DHFR do *S. aureus* e da enzima humana revelam a presença de uma cadeia polipeptídica formada por 157 e 186 aminoácidos respectivamente, apresentando ambas, um subdomínio de ligação à adenosina e outro subdomínio rico em alças (Figura 5).

Figura 5. Estrutura da hDHFR humana (à esquerda) e da SaDHFR do *S. aureus* (à direita). **Fonte:** A figura foi gerada com o programa Pymol (www.pymol.org) usando o código PDB 1kmv e PDB 3sr5.

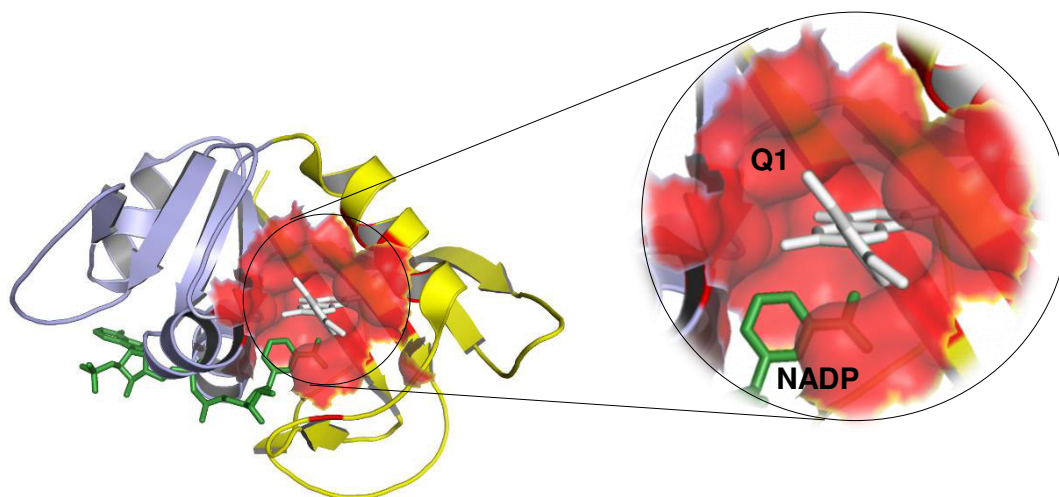


Os subdomínios de ligação à adenosina e de alças são mostrados em azul e amarelo respectivamente⁷¹. A coenzima NADPH e os inibidores L11 (humana) e Q12 (*S. aureus*) são mostrados em vermelho.

A DHFR é expressa tanto em organismos eucariontes quanto em procariontes, possuindo grande importância no metabolismo celular⁷². A sua inibição é uma importante estratégia farmacológica no tratamento de doenças infecciosas causadas por fungos, protozoários e bactérias, além de doenças autoimunes e câncer⁷³.

O sítio ativo da DHFR localiza-se entre os subdomínios de ligação à adenosina e o subdomínio de alças, estando a maior parte da molécula da coenzima NADPH localizada no subdomínio de ligação à adenosina (Figura 6).

Figura 6. Sítio ativo da DHFR do *S. aureus*. A figura foi gerada com o programa Pymol (www.pymol.org) usando o código PDB 3SR5.



A superfície do sítio ativo é esboçada em vermelho. O inibidor Q12 é mostrado em branco e a coenzima NADPH em verde.

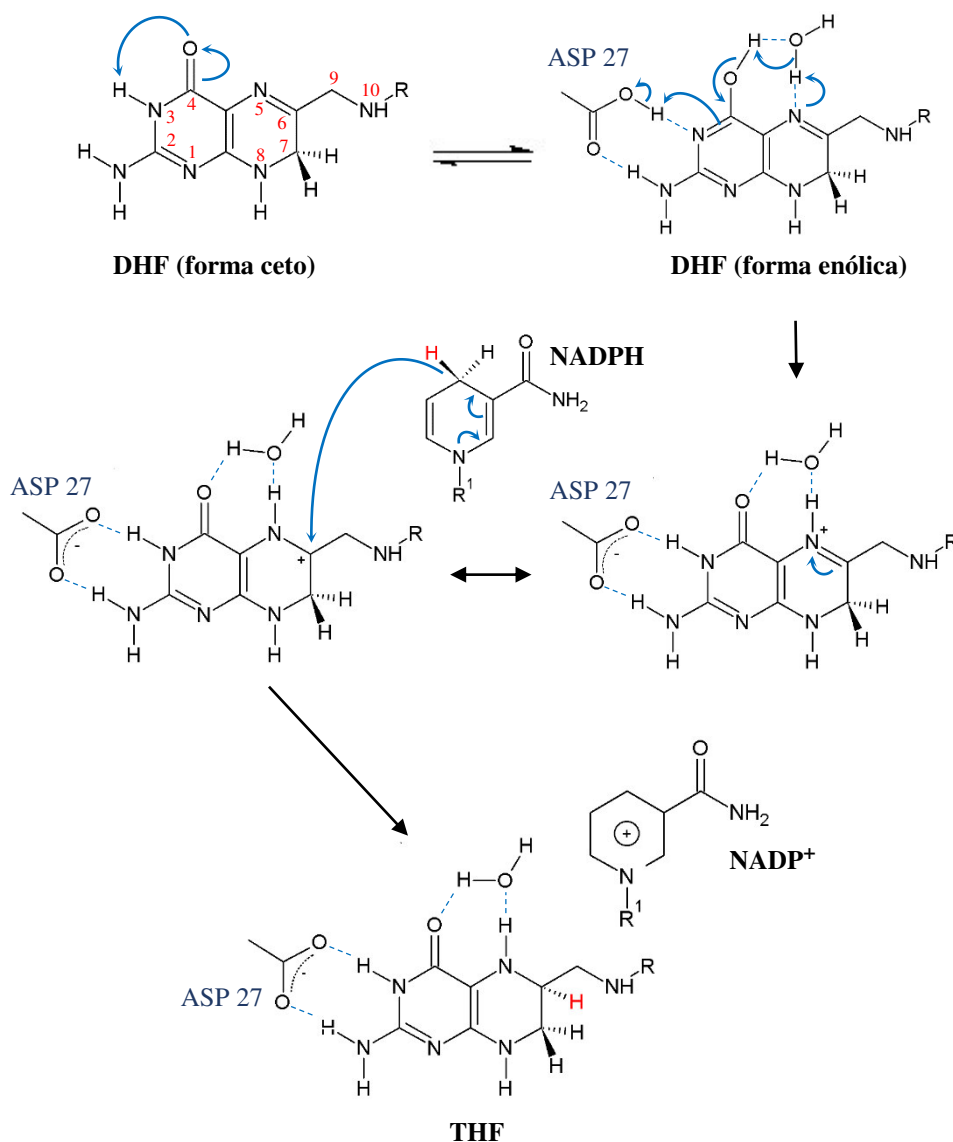
1.4.2. Mecanismo catalítico

O mecanismo catalítico da redução do diidrofolato (DHF) à tetraidrofolato (THF) embora tenha sido objeto de estudo por parte de bioquímicos, químicos experimentais e teóricos, não encontra-se totalmente elucidado, sendo a transferência de um hidreto do NADPH para o substrato uma certeza sobre este processo catalítico⁷⁴.

A porção pteridina do diidrofolato suporta quatro tautômeros, sendo a forma lactâmica (ceto) apontada como a mais estável em solução^{75, 76}. Estudos cristalográficos, espectroscópicos e teóricos confirmam essa tautomerização *in situ*⁷⁷⁻⁷⁹. Apesar do processo de tautomerização ser mencionada como necessária à catálise, dados recentes de cristalografia de nêutrons de ultra-resolução demonstram que a protonação do N5 suporta a existência da forma ceto, sugerindo que a coexistência dos dois tautômeros é desnecessária à catálise⁸⁰.

O processo catalítico da redução do DHF ocorre em duas etapas principais: protonação do nitrogênio 5 do anel pteridina do DHF, formando um intermediário carregado, e a transferência de um íon hidreto para a espécie carregada, gerando um molécula neutra (Figura 7)⁸¹.

. **Figura 7.** Mecanismo catalítico da redução do diidrofolato pela DHFR⁸⁰⁻⁸³.



DHF- diidrofolato; ASP 27 – aspartato 27; NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida; NADP⁺ – nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada.

Estudos de mutação sítio-dirigida demonstram que o aspartato 27 (aspartato 28 na SaDHFR) possui um papel crucial na protonação do substrato e catálise,

visto que sua substituição leva a uma redução significativa na atividade catalítica^{84, 85}.

O mecanismo catalítico tem sido estudado através de vários métodos teóricos incluindo; semiempíricos, teoria do funcional de densidade (DFT), perturbativos e de métodos híbridos baseados na mecânica quântica/mecânica molecular⁸⁶⁻⁸⁹. A polarização do substrato pela enzima, tem sido reportada como um importante passo na redução tanto do ácido fólico quanto do DHF, além de sugerir informações sobre a posição e a ordem das reduções nesses substratos⁸⁷. Estudos de perturbação de energia livre combinado com dinâmica molecular sugerem que a flutuação da alça L1 da DHFR modula o pKa do nitrogênio 5 da DHF, além de fomentar a hipótese que o DHF sofre protonação direta pelo solvente⁹⁰.

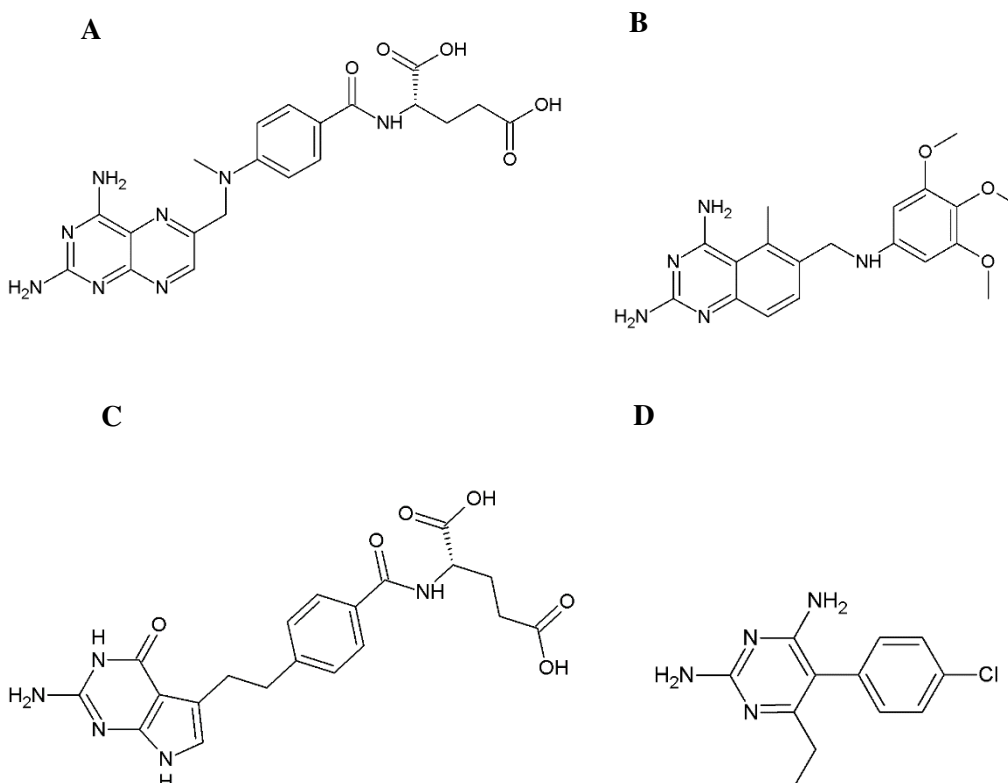
1.4.3. Inibidores da DHFR

A descoberta dos antifolatos iniciou-se com as observações de que o tratamento com ácido fólico em pacientes com anemia megaloblástica não responsiva à vitamina B12, demonstrava efeitos curativos. Como a leucemia aguda infantil possui algumas características morfológicas com a anemia megaloblástica, o tratamento dessa neoplasia com ácido fólico fora experimentado porém, o ácido fólico demonstrou-se ineficaz, além de acelerar a progressão da doença⁹¹.

Confirmando o papel do ácido fólico na leucemia, outro estudo, agora com pacientes sujeitos a uma dieta deficiente em folatos, demonstrou que a baixa ingestão de folatos estava associada a uma diminuição das células leucêmicas⁹².

Baseado nessas evidências clínicas, análogos ao ácido fólico foram sintetizados, levando a descoberta da aminopterina, o primeiro antifolato a propiciar remissão temporária da leucemia aguda em crianças⁹³. Posteriormente, um análogo metilado da aminopterina fora desenvolvido, o metotrexato (Figura 8), exibindo uma alta potência contra enzima humana, com $IC_{50} = 8$ nM, demonstrando uma seletividade 100 vezes maior para a enzima humana quando comparada a DHFR de protozoários^{13, 94, 95}.

Figura 8. Estruturas químicas dos inibidores da DHFR. Metotrexato (A), trimetrexato (B), pemetrexede (C) e pirimetamina (D).

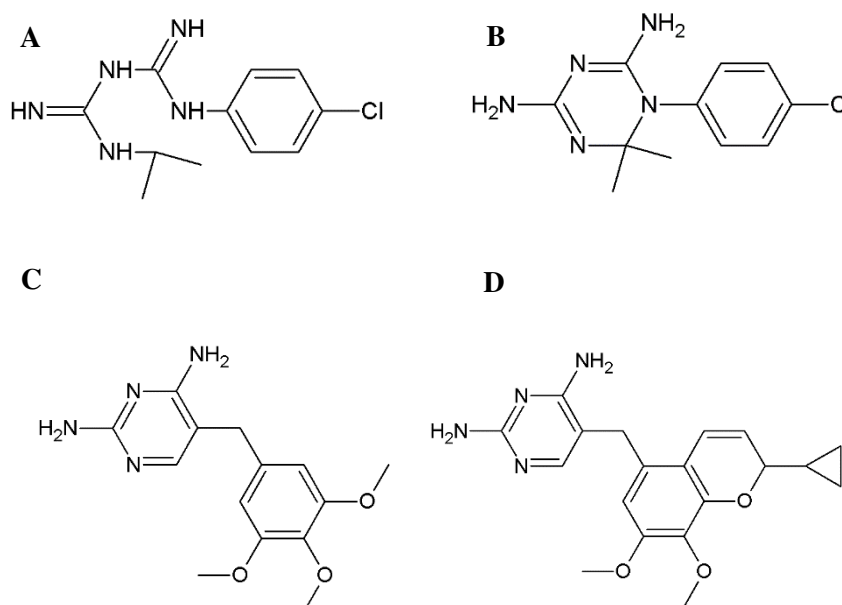


Com o intuito de evitar o sistema de transporte através de carreadores específicos, inibidores lipossolúveis da DHFR foram sintetizados, destacando-se o trimetrexato (Figura 8), um antifolato não clássico, que apesar de apresentar uma menor potência antitumoral quando comparado ao metotrexato, demonstrou-se eficaz no tratamento de pneumonia causada pelo fungo *Pneumocystis carinii* quando usado concomitantemente com leucovorin, um antídoto específico empregado para proteger as células do hospedeiro dos efeitos tóxicos do trimetrexato porém, sem afetar as ações antifúngicas do mesmo^{96, 97}.

Um dos mais novos antifolatos desenvolvidos, o pemetrexede (Figura 8), atua por meio da inibição de múltiplos alvos moleculares, inibindo a timidilato sintase, a glicinamida ribonucleotídeo transformilase, e a DHFR, demonstrando-se eficaz no tratamento do mesotelioma pleural maligno quando usado de forma combinada à cisplatina^{96, 98}.

A pirimetamina (Figura 8), outro inibidor da DHFR, possui uma alta afinidade pela enzima de protozoários, sendo 1400 vezes mais seletiva para a DHFR desses, quando comparada a enzima humana, demonstrando-se um antimalárico com características profiláticas e supressoras de sintomas, privilegiadas^{13, 99}. Além da pirimetamina, outros inibidores da DHFR parasitária foram desenvolvidos, dentre os de uso clínico, encontram-se o proguanil e o seu metabólito cicloguanil (Figura 9)⁹⁶.

Figura 9. Estruturas químicas dos inibidores da DHFR. Proguanil (A), cicloguanil (B), trimetoprima (C) e iclaprim (D).



Estudando os papéis celulares de análogos a purinas e pirimidinas, e com o intuito de modular de forma farmacológica a via do folato, George H. Hitchings e seu grupo, desenvolveram a trimetoprima (Figura 9), uma 2,4-diaminopirimidina capaz de inibir de forma competitiva o metabolismo dos ácidos nucleicos, usando como microrganismo de referência o *Lactobacillus casei*¹⁰⁰. A constante de inibição da trimetoprima frente a DHFR do *S. aureus* é de 1,24 nM, enquanto que a constante de inibição para a enzima humana é 19700 nM, demonstrando-se 15000 vezes mais seletivo para a enzima bacteriana¹⁰¹.

O perfil farmacológico favorável da trimetoprima não limita-se as suas características farmacodinâmicas, visto que o mesmo apresenta uma biodisponibilidade absoluta por via oral maior que 60% e uma meia vida média de 10 horas⁹⁶. Porém seu uso selecionou microrganismos resistentes, dentre eles o *S. aureus*, que adquiriu resistência ao trimetoprima através de uma mutação que substituiu a fenilalanina 98 (Phe98) pela tirosina (Tyr98) no sítio ativo¹⁰².

A substituição da Phe98 pela Tyr98 (mutação F98Y), gerou uma ligação de hidrogênio entre a hidroxila da fenilalanina 98 e a carbonila da cadeia principal da leucina 5 (Leu5), dificultando a formação da ligação de hidrogênio desse aminoácido com o grupo amina da trimetoprima, aumentando a energia livre de ligação da trimetoprima de -12,187 kcal/mol na enzima nativa, para -10,305 kcal/mol na enzima mutada, e consequentemente elevando a concentração inibitória mínima (MIC) de 1 para 32 µg/mL¹⁰¹⁻¹⁰³.

Recentes esforços para o desenvolvimento de inibidores da DHFR do *S. aureus* com a mutação F98Y (SaDHFR_{F98Y}) culminaram na descoberta do iclaprim (Figura 9), a mais nova 2,4-diaminopirimidina, que apresenta uma potente e rápida ação bactericida contra *S. aureus* sensível e resistente à metilicina, além do *S. aureus* com a mutação F98Y¹⁰³.

O iclaprim possui um IC₅₀ frente a SaDHFR_{F98Y} de 27 nM, enquanto que para a trimetoprima este valor é de 1200 nM demonstrando-se, aproximadamente, 40 vezes mais potente *in vitro*¹⁰³. Além disso, o iclaprim é 9500 e 900 vezes mais seletivo para a SaDHFR e SaDHFR_{F98Y} respectivamente, quando comparado a enzima humana^{101, 103}.

Apesar das características *in vitro* e clínicas promissoras, o iclaprim possui uma biodisponibilidade por via oral de 40%, um valor menor quando comparado à da trimetoprima, que é de 60%^{96, 104, 105}. Diante disso, o desenvolvimento de novos inibidores da SaDHFR com propriedades farmacocinéticas superiores torna-se necessário para o estabelecimento de regimes terapêuticos eficazes e seguros.

Para auxiliar no desenvolvimento de fármacos, métodos computacionais baseados na mecânica clássica, mecânica quântica e/ou estatísticos podem ser empregados nas etapas iniciais para selecionar compostos com propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas promissoras.

1.5. Planejamento *in silico* de fármacos

1.5.1. Mecânica molecular

A mecânica molecular utiliza potenciais clássicos para modelar os sistemas. Estes métodos não resolvem a equação de Schrödinger, uma vez que os elétrons do sistema são tratados de forma implícita¹⁰⁶. A energia é calculada em função das posições nucleares onde as moléculas são vistas como um conjunto de núcleos conectados entre si potenciais empíricos. A maior desvantagem deste método é a sua incapacidade de descrever propriedades que dependem da distribuição eletrônica, mas em compensação, produz uma enorme redução do custo computacional (tempo de processamento), o que permite a manipulação de grandes sistemas moleculares, como sistemas biológicos, e possibilita resolver problemas nos quais é necessário obter propriedades termodinâmicas de natureza macroscópica.

Os campos de força são descritos por um somatório de equações clássicas que descrevem a energia potencial associada aos movimentos de estiramento, flexão, rotação e forças intermoleculares, como ligações de hidrogênio e forças de van der Waals, onde as constantes de cada potencial podem ser obtidas por meio de dados espectroscópicos ou cálculos *ab initio*^{107, 108}. Esses descrevem a energia total de uma molécula, como sendo, em geral, dada pela soma de quatro ou mais termos¹⁰⁹: No entanto, todos eles possuem, pelo menos, os quatro termos abaixo:

$$E = E_s + E_b + E_w + E_{nb} \quad (1)$$

Onde cada termo **E** representa a função potencial que descreve a energia de estiramento ou compressão de uma ligação (**E_s**), a energia de deformação angular (**E_b**), a energia de torção em torno das ligações (**E_w**) e a interação não-ligante (**E_{nb}**).

A energia de estiramento ou compressão (**E_s**) de uma ligação, pode ser modelada através da Equação (2), onde **K_i** representa a constante de força, **l** e **l₀** representam os comprimentos de ligação e o comprimento de ligação livre de tensão¹⁰⁹.

$$E_s = \sum_l K_l \frac{(l - l_0)^2}{2} \quad (2)$$

De forma análoga à expressão para a energia de estiramento, a energia de deformação angular pode ser expressa pela Equação (3), onde os comprimentos de ligação e de ligação livre de tensão são substituídos pelos ângulos de ligação (θ) e de ligação livre de tensão (θ_0) respectivamente¹⁰⁹.

$$E_b = \sum_{\theta} K_{\theta} \frac{(\theta - \theta_0)^2}{2} \quad (3)$$

A modelagem da energia de torção em torno das ligações é expressa pela equação (4), onde V_w indica a constante de força, w o ângulo torcional e n a periodicidade de V_n .

$$E_w = \sum_w \frac{V_w (1 \pm \cos nw)}{2} \quad (4)$$

O último termo do campo de força modela a energia de interação entre átomos não conectados (E_{nb}), sendo F_r a constante de força e α um fator que correlaciona a distância interatômica entre os átomos não ligados com as constantes de van der Waals r_1^* e r_2^* como demonstra a Equação (5).

$$E_{nb} = \sum F_r \left\{ -\frac{2}{\alpha^6} + \exp[12(1 - \alpha)] \right\} \quad (5)$$

$$\alpha = \frac{r}{r_1^* + r_2^*}$$

A modelagem das interações eletrostáticas entre o ligante e o receptor é representada como o somatório entre as interações de pares de átomos por meio da equação potencial de Coulomb¹¹⁰:

$$E_{\text{coul}}(r) = \sum_{i=1}^{N_A} \sum_{j=1}^{N_B} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \quad (6)$$

Na Equação (6) N representa o número de átomos na molécula, q_i e q_j indicam as cargas atômicas do par de átomos envolvidos na interação e r_{ij} a distância entre os dois átomos^{110, 111}.

As interações de van der Waals entre o ligante e o receptor na maioria das vezes são modeladas empregando o potencial de Lennard-Jones, Equação (7), onde ϵ representa a profundidade do poço, σ o diâmetro de colisão dos dois átomos envolvidos na interação e r_{ij} a distância entre eles¹¹¹.

$$E_{\text{vdW}}(r) = \sum_{j=1}^N \sum_{i=1}^N 4\epsilon \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad (7)$$

A mecânica molecular possui a vantagem de poder ser aplicada a sistemas contendo número significativo de átomos podendo, em alguns casos, fornecer resultados tão precisos quanto os provenientes dos métodos baseados na mecânica quântica, com menor gasto computacional, embora propriedades dependentes da distribuição eletrônica não possam ser obtidas¹¹².

1.5.2. Mecânica quântica

Em muitos momentos é necessário calcular propriedades que dependem da distribuição dos elétrons, neste instante a química quântica é usada para obter a solução da equação de Schrödinger para a determinação precisa de propriedades moleculares e atômicos. Os métodos quânticos se dividem em duas linhas: os semiempíricos e os *ab initio*s.

Uma vez que solução exata só é encontrada para sistemas muito simples, em geral usa-se aproximações para resolver problemas de interesse químico. Todos os métodos que serão discutidos não consideram efeitos relativísticos e usam a aproximação de Born-Oppheimer¹¹³. Assim, o problema consiste em resolver a equação de Schrödinger eletrônica de forma paramétrica em relação aos núcleos¹⁰⁹.

$$H\Psi = E\Psi \quad (8)$$

Hartree propôs uma forma funcional simples para a função de onda no intuito de facilitar o cálculo. A função de onda de N elétrons foi escrita como o produto de N funções de um elétron (orbitais), desta forma troca-se o problema de resolver uma equação de N elétrons por um conjunto de N equações de um elétron¹⁰⁸. A proposta de Hartree foi retificada por Fock ao mostrar que a função de onda deveria ser antissimétrica com respeito a troca de dois elétrons. O método desenvolvido por Hartree e Fock, também é chamado do método das partículas independentes, uma vez que a probabilidade de eventos independentes que ocorrem simultaneamente é o produto das probabilidades individuais.

A solução do método Hartree-Fock mesmo assim tinha um custo computacional elevado. Intuído de ultrapassar essa barreira Roothaan propôs escrever os orbitais moleculares como uma combinação linear dos orbitais atômicos (LCAO). Fornecendo uma solução e um problema: a equação de Hartree-Fock deixou de ser um problema de equações integro-diferenciais para ser um problema de álgebra linear, bem mais simples. No entanto, sua solução passou a ser dependente do conjunto LCAO (funções de base).

O método de Hartree-Fock descreve em média 95% da energia total de uma molécula, porém a química em alguns casos encontra-se nos 5% restantes. Portanto, precisa-se de uma solução que descreva a parte da energia não descrita, denominada energia de correlação.

Vários métodos que buscam descrever a energia de correlação usam as funções de ondas Hartree-Fock do estado fundamental combinadas com funções dos estados excitados, por isso são denominados métodos pós-Hartree-Fock.

O método configuração de interação (CI) é o mais simples de entender, porém de difícil implementação computacional, mas quando completo é o melhor resultado possível obtido na função de base utilizada, porém, em geral é impraticável. Quando truncado não é mais extensivo – um problema para estudar reações químicas. Os métodos perturbativos *Moller-Plesset* (MPn) e *Coupled*

Cluster (CC), descrevem uma grande parte da energia de correlação, no entanto são impraticáveis para moléculas de tamanho mediano (cerca de 30 átomos).

Hoje há uma infinidade de *softwares* disponíveis para cálculos *ab initio*. Por exemplo, o GAMESS que oferece várias opções de níveis de cálculo, que tratam desde simples moléculas a mecanismos reacionais complexos¹¹⁴.

Os métodos semi-empíricos quânticos foi uma maneira, computacionalmente barata, encontrada para descrever moléculas com tamanho inacessível aos métodos *ab initio*s. Os mais populares usam o formalismo Hartree-Fock-Roothaan com um conjunto de base mínima para descrever os elétrons de valência, diminuindo a medida do problema.¹¹⁵ As integrais de repulsão entre densidades eletrônicas envolvendo *overlap*, podem ser assumidas muito pequenas, podendo assim serem desconsideradas (aproximação *Zero Differential Overlap* - ZDO). Desta forma a matriz de *overlap* é transformada em uma matriz unitária deixando a solução das equações de autovalores - autovetores bem mais simples. Há várias maneiras de aplicar a aproximação ZDO, as quais se diferenciam pelo número de integrais desconsideradas^{106, 108}. Tais aproximações podem levar a grandes desvios, para compensar esse problema foram incorporados parâmetros empíricos que se ajustam a dados experimentais ou teóricos de alto nível.

O grande sucesso dos métodos semi-empíricos aconteceu na química orgânica, tanto que os métodos mais antigos usavam quase exclusivamente, apenas orbitais *s* e *p*. O uso dos orbitais *d* veio a ocorrer apenas nos anos 90 com o método MNDO/d, usado para descrever elementos de transição da tabela periódica. O MNDO é o primeiro de uma série de métodos semi-empíricos de grande sucesso. O AM1, PM3 diferem do MNDO apenas pela descrição da interação caroço-caroço, cuja correção conseguiu melhorar inúmeras falhas do método MNDO. No entanto, há divergência se o PM3 tem resultados superiores ao AM1 quando testados com moléculas similares a parametrização do AM1, mas é certo que o PM3 descreve com maior exatidão compostos hipervalentes.

Com o crescente uso da teoria do funcional da densidade (*DFT*) pelos químicos teóricos, os usuários dos métodos semi-empíricos foram motivados a continuar com seu desenvolvimento. Assim, novas parametrizações e algoritmos de escalonamento linear surgiram aumentando a possibilidade do uso destes métodos. Por exemplo: i) o PM6 e PM7 são usados para moléculas orgânicas,

inorgânicas e estruturas sólidas; ii) O algoritmo MOZYME possibilita calcular moléculas biológicas tal como uma proteína. Esses métodos têm excelente relação entre exatidão e eficiência computacional para sistemas que são inacessíveis aos métodos *ab initio*, sendo essenciais para sistemas onde necessita-se calcular inúmeras vezes um mesmo sistema molecular ou calcular vários compostos como dinâmica molecular e QSAR, respectivamente.

1.5.3. Docagem molecular

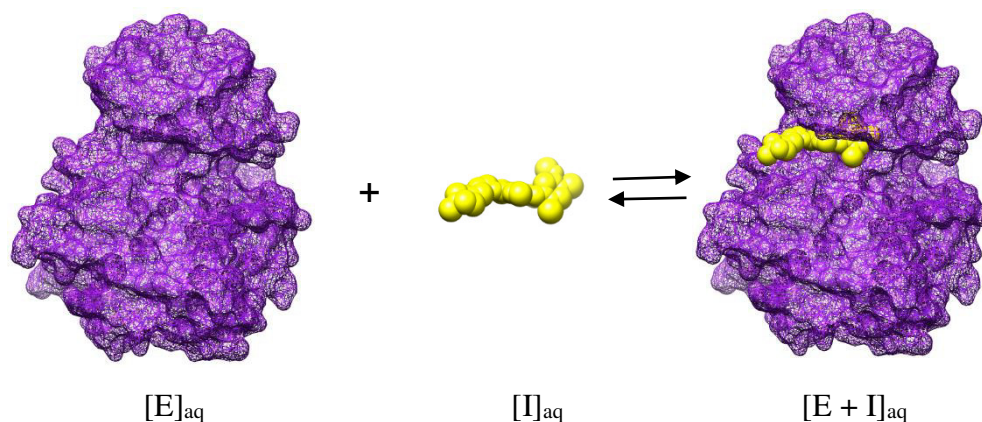
Interações intermoleculares existentes em sistemas binários como proteína-proteína, enzima-substrato e DNA-proteína exercem papel fundamental em vários processos biológicos, que incluem, o reconhecimento antígeno-anticorpo, a inibição enzimática, a transdução de sinal, o controle da expressão gênica, a regulação e o transporte celular^{116, 117}.

Dentre as ferramentas disponíveis para o estudo dessas interações destaca-se a docagem molecular (Figura 10), uma técnica computacional que permite a previsão da conformação de menor energia entre uma molécula receptora (proteína, DNA) e uma ligante (pequena molécula ou outra proteína) com aplicações no entendimento de processos bioquímicos fundamentais e no processo de planejamento de novos fármacos^{117, 118}.

No processo de inibição enzimática, um inibidor, geralmente uma molécula de baixo peso molecular, encontra-se em equilíbrio na sua forma livre $[I]_{aq}$ e complexada à enzima $[E + I]_{aq}$ em condições de equilíbrio, dessa forma a docagem molecular pode auxiliar no entendimento do correto encaixe¹¹⁰.

O processo de docagem molecular objetiva a previsão da conformação do ligante (denominada pose) na cavidade do receptor e a avaliação da sua capacidade de ligação¹¹⁹. Para isso, o primeiro passo é a realização de uma amostragem conformacional do ligante no sítio de ligação do receptor, realizada por um algoritmo de busca, seguida por uma classificação das conformações por meio de uma função de pontuação, sendo que o algoritmo de busca deverá ser capaz de reproduzir a conformação experimental do ligante, e a função de pontuação, de classificá-lo como a melhor conformação dentre as demais geradas¹¹⁹.

Figura 10. Estado de equilíbrio entre o ligante bosutinib na sua forma livre $[I]_{aq}$ e complexado ao seu receptor, a Abl tirosina quinase $[E + I]_{aq}$. A figura foi gerada com o programa UCSF Chimera v1.10.1¹²⁰ usando o código PDB 3ue4.



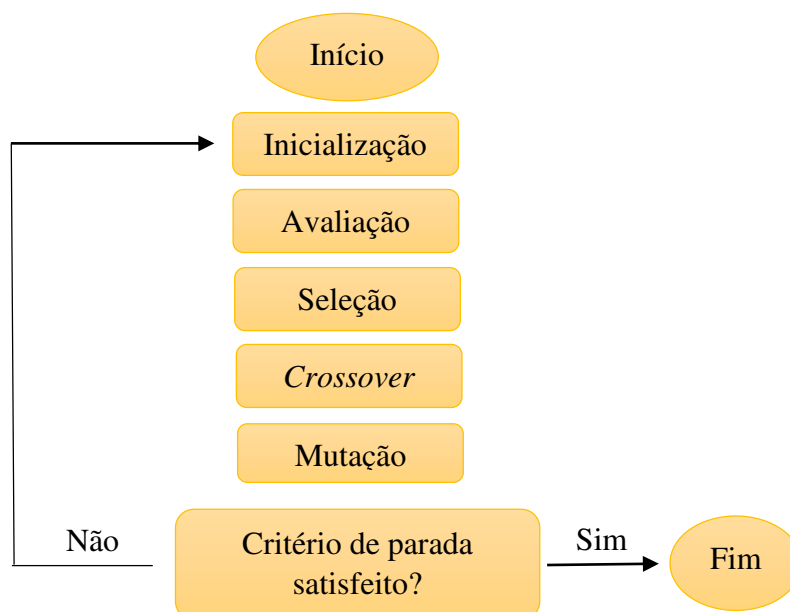
O ligante é representado como um conjunto de esferas amarelas e o receptor é representada por sua superfície em malha roxa.

Os tipos de algoritmos de busca implementados nos programas de docagem molecular disponíveis incluem aqueles baseados em construção incremental, Monte Carlo seguido por minimização de energia, semelhança molecular baseada na superfície, descritores correspondentes, forma de correspondência e algoritmo genético¹²¹⁻¹²⁷.

Os algoritmos genéticos baseiam-se em uma pesquisa populacional para otimização e resolução de problemas¹²⁸. Estes métodos são fundamentados na teoria da evolução Darwiniana, onde os graus de liberdade do ligante e/ou do receptor são locados em “cromossomos” na forma de informação binária, sendo cada variável um gene, assim cada cromossomo representa uma conformação diferente do ligante^{119, 121}.

O primeiro passo do algoritmo genético é denominado iniciação (Figura 11), a qual gera de forma aleatória um conjunto de possibilidades (conformações) denominado população¹²⁹.

Figura 11. Fluxograma do algoritmo genético. **Fonte:** Crisan (2003)¹²⁹.



Em seguida todos os indivíduos (conformações) dessa população são avaliados e selecionados por meio da função de pontuação, que classificará os indivíduos quanto a sua aptidão, para que os com maior pontuação sejam selecionados (Figura 11)¹³⁰. Os melhores indivíduos selecionados são então hibridizados em uma operação denominada *crossover* e em seguida submetidos a um mutação aleatória (Figura 11)¹¹⁹.

Após as operações *crossover* e mutação, os indivíduos resultantes são avaliados segundo o critério de finalização do algoritmo. Caso este tenha sido atendido, os indivíduos serão o conjunto de solução, caso não, estes indivíduos serão submetidos aos passos iniciais do algoritmo pela quantidade de vezes que for necessário para que o critério de finalização do algoritmo seja atingido^{110, 129, 130}.

Após a geração de uma população de conformações do ligante no sítio de interesse do receptor por meio do algoritmo de busca, funções de pontuação são aplicadas a estas poses, classificando-as segundo a suas energias de ligação ao receptor¹³¹. Essas funções de pontuação são divididas em três diferentes classes: funções de pontuação baseadas no conhecimento, empíricas e funções baseadas em campos de força^{110, 116}.

As funções baseadas no conhecimento empregam dados estatísticos experimentais, como a frequência de determinadas distâncias e contatos interatômicas disponíveis em grandes bancos de dados cristalográficos de complexos proteína-ligante, inferindo que as interações moleculares que estão mais próximas da frequência máxima dentro do banco de dados, favorecem a interação ligante-receptor, enquanto que as interações que surgem com menor frequência na base de dados contribuem de forma negativa para a ligação entre o ligante e o receptor¹³¹.

Diversas funções baseadas no conhecimento foram desenvolvidas para prever a afinidade de ligantes pelos seus receptores como PMF¹³², DrugScore¹³³, SmoG¹³⁴ e Bleep¹³⁵. A possibilidade de analisar grandes bancos de dados devido a sua simplicidade computacional é uma vantagem dos métodos baseados em conhecimento, sendo sua maior desvantagem a dependência do conjunto de dados usados na parametrização¹¹⁰.

As funções empíricas foram desenvolvidas para reproduzir dados experimentais provenientes de complexos cristalográficos como energia de ligação e conformação, por meio de equações compostas por diversas funções parametrizadas, como a função pioneira LUDI desenvolvida por Böhn¹³⁶. Os coeficientes das funções empíricas são obtidos por meio de regressões de dados experimentais como energia de ligação e informações cristalográficas¹¹⁰. De forma análoga às funções baseadas no conhecimento, a vantagem das funções empíricas é sua simplicidade quando comparado aos campos de forças, embora a dependência do conjunto de dados usados na regressão seja uma desvantagem desse método¹¹⁰.

As funções baseadas em campos de força, também conhecidas como métodos baseados nos primeiros princípios, calculam a energia de ligação entre o ligante e o receptor através da soma de termos individuais de diferentes tipos de interação sendo a pontuação obtida por meio da teoria físico-química e não através de ajustes baseados em dados experimentais¹³⁷.

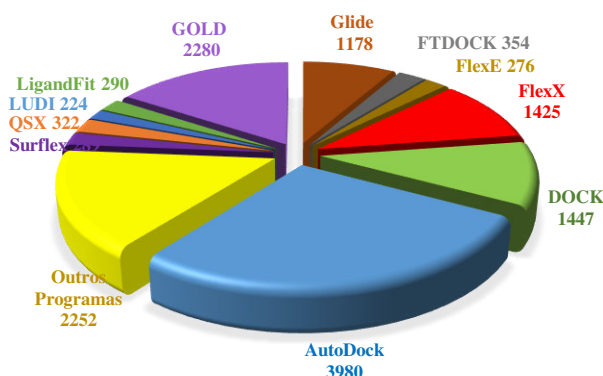
Os termos contidos nos campos de força modelam as interações entre o ligante e o receptor (forças de van der Waals, forças eletrostáticas e forças associadas aos movimentos de estiramento/compressão, flexão e torção)¹¹¹. Os parâmetros empregados nas funções baseadas em campos de força geralmente

são obtidos por meio de dados experimentais e cálculos *ab initio* provenientes da mecânica quântica de acordo com os princípios da física¹¹¹.

Apesar da sólida fundamentação física das funções de pontuação baseadas em campos de força, estas possuem grandes limitações, pois as contribuições entálpicas foram modeladas em fase gasosa e não incluem termos entrópicos e de solvatação^{110, 111}. Outra desvantagem é que no tratamento das interações não ligantes faz-se necessário a introdução de uma distância de corte, gerando imprecisão na contribuição de ligações de longo alcance¹¹⁰.

Dezenas de programas de docagem molecular estão disponíveis, sendo o AutoDock, líder no número de citações, seguido pelo Gold e DOCK (Figura 12)¹¹⁶.

Figura 12. Programas de docagem molecular mais citados entre 2001 e 2011. Os programas publicados em 2011 não foram incluídos. **Fonte:** Sousa (2013)¹¹⁶.



O AutoDock possui cinco versões; AutoDock 1, AutoDock 2.4, AutoDock 3, AutoDock 4, AutoDock 4.2 e o AutoDock Vina^{121, 138-142}. O AutoDock 4.2 inclui uma flexibilidade limitada no receptor, além de dispor de métodos de busca baseados em algoritmo genético, algoritmo genético Lamarckiano e Monte Carlo^{116, 141}. Como demonstra a equação (9), sua função de pontuação contém termos para dispersão/repulsão, ligação de hidrogênio, forças eletrostáticas e um termo para dessolvatação¹⁴⁰.

$$V = W_{vdw} \sum_{i,j} \left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right) + W_{ligh} \sum_{i,j} E(t) \left(\frac{C_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{r_{ij}^{10}} \right)$$

$$+ W_{\text{ele}} \sum_{i,j} \frac{q_i q_j}{\epsilon(r_{ij}) r_{ij}} + W_{\text{sol}} \sum_{i,j} (S_i V_j + S_j V_i) e^{\left(\frac{-r_{ij}^2}{2\sigma^2}\right)} \quad (9)$$

O AutoDock Vina, o mais novo programa de docagem molecular desenvolvido pelo *Scripps Research Institute*, herda algumas características do AutoDock 4, porém é conceitualmente projetado de forma distinta¹¹⁶. Sua função de pontuação é mista, englobando funções baseadas no conhecimento e funções de busca empíricas, com termos para interação estérica (ΔG_{at} , ΔG_{rep}), ligação de hidrogênio (ΔG_{ligh}), hidrofobicidade (ΔG_{hid}) e um termo torcional (ΔG_{torc}) como demonstra a Equação (10)¹⁴².

$$\Delta G_{\text{ligação}} = \Delta G_{\text{atra}} + \Delta G_{\text{rep}} + \Delta G_{\text{ligh}} + \Delta G_{\text{hid}} + \Delta G_{\text{torc}} \quad (10)$$

De acordo com a flexibilidade das moléculas, os métodos de docagem molecular podem ser classificados em três classes¹¹⁶:

- **Docagem rígida** – tanto o receptor quanto o ligante são tratados como corpos rígidos desprovidos dos graus de liberdade conformacionais, possuindo apenas os graus rotacionais e translacionais.
- **Docagem ligante-flexível** - o receptor é tratado como um corpo rígido e o ligante flexível.
- **Docagem receptor-flexível/ligante-flexível** – o ligante é tratado de forma flexível e o receptor com uma flexibilidade limitada.

Antes do emprego de um protocolo de docagem molecular faz-se necessária a validação deste, por métodos que avaliem sua exatidão, como a raiz quadrada do desvio médio ou RMSD (do inglês, *root-mean-square deviation*)¹⁴³. Neste método, o RMSD é empregado para avaliar o sucesso do programa de docagem, sendo considerado um bom programa de docagem aquele que possuir a habilidade de reproduzir a conformação experimental do ligante complexado ao receptor (redocagem molecular)¹⁴⁴.

Inicialmente no processo de redocagem (do inglês “*redocking*”) o ligante experimental é removido da estrutura cristalográfica e em seguida a docagem é realizada afim de o algoritmo de busca recuperar a estrutura experimental do

ligante no receptor¹⁴⁴. Em seguida, a conformação experimental e docada (pose) do ligante são alinhadas e o RMSD entre ambas é calculado¹⁴⁴.

O RMSD é calculado entre os átomos pesados da conformação experimental e da pose por meio da Equação (11), onde D_i é a distância entre o átomo i nas duas conformações e N o número de átomos pesados contidos no ligante, sendo um valor RMSD menor que 2 Å satisfatório para definir a exatidão do protocolo de docagem molecular^{117, 143, 145}.

$$\text{RMSD} = \sqrt{\sum_{i=1}^N \frac{D_i^2}{N}} \quad (11)$$

Com o aumento no número de proteínas que possuem estrutura terciária elucidada devido aos grandes projetos de determinação estrutural que selecionam proteínas alvos pelo potencial terapêutico que essas biomoléculas apresentam^{110, 146, 147}, protocolos de docagem molecular estão sendo empregados para identificar “hits” e também para otimizar compostos líderes, pois análogos podem ser testados de forma rápida, em modelos computacionais antes mesmo da sua síntese¹¹⁰.

Como a docagem molecular objetiva o uso de modelos de alvos moleculares para a descoberta de novos ligantes, com características distintas daqueles já conhecidos, a seleção de falsos positivos e negativos não inviabiliza seu uso como ferramenta de busca porém, os verdadeiros inibidores descobertos devem se apresentar em taxas suficientemente elevadas para justificar o esforço empregado¹⁴⁸.

Em um estudo comparativo entre a técnica de triagem biológica automatizada em larga escala (HTS) e a triagem virtual para a busca de inibidores da proteína tirosina fosfatase 1B envolvida na patogênese do diabetes tipo II, a triagem virtual apresentou uma taxa de sucesso 34,8% enquanto que para a HTS este valor fora de 0,021%. Além disso, os inibidores descobertos pela triagem virtual apresentaram perfil fármaco-similar (do inglês *drug-like*) maior que os inibidores descobertos por HTS¹⁴⁹. A comparação entre esses dois estudos torna-se difícil, pois os mesmos empregaram bibliotecas de moléculas distintas¹⁴⁸.

Uma comparação mais coerente foi realizada por Paiva e colaboradores empregando uma única biblioteca de moléculas para a triagem virtual e HTS contra a enzima diidropicolinato redutase do *Mycobacterium tuberculosis*¹⁵⁰. Neste estudo a abordagem por modelagem molecular demonstrou-se mais eficiente que os métodos de triagem convencionais, com um percentual de moléculas verdadeiramente inibidoras menor que 0,2% para HTS e 6% para triagem virtual, embora a HTS permitiu a descoberta de inibidores com maior diversidade estrutural.

Nos últimos anos a docagem molecular vem sendo empregada de forma isolada ou combinada a outras técnicas, na descoberta de inibidores enzimáticos com posterior validação experimental, nos mais diversos alvos moleculares que incluem as enzimas quinases dependentes de ciclina, receptores de serotonina, serina/treonina quinase, proteína de ligação a ácidos graxos 4, dTDP-deoxi-lixo-4-hexulose redutase e aurora quinase¹⁵¹⁻¹⁵⁷.

1.5.4. Relação quantitativa entre estrutura e atividade

Todas as informações químicas, físicas e biológicas de um determinado composto em princípio, estão contidas na sua fórmula estrutural sendo que, se essas informações forem decodificadas, as propriedades de um composto poderiam ser extraídas de forma direta da sua estrutura química¹⁵⁸.

O primeiro trabalho que correlacionou de forma quantitativa a relação estrutura/atividade fora proposta por Crum-Brown e Fraser em 1868 quando estudavam a atividade biológica de diferentes alcalóides¹⁵⁹. Em seus estudos, notaram que a alquilação do nitrogênio básico com geração de um composto quaternário carregado, ocasionava mudanças nos efeitos biológicos, concluindo assim, que a “atividade fisiológica” representada pela letra grega Φ (phi) deveria ser função da estrutura química **C** (Equação 12)¹⁵⁹.

$$\Phi = f(C) \quad (12)$$

Umas das pioneiras contribuições para o desenvolvimento do QSAR (relação quantitativa entre estrutura química e atividade biológica) foi

desenvolvido por Hammett em sua obra “Physical Organic Chemistry: reactions, equilibria and mechanisms” publicado em 1940, no qual ao estudar ácidos benzoicos substituídos, demonstrou a relação linear entre os logaritmos das constantes de ionização do ácido benzóico e os logaritmos das constantes de ionização do ácido benzóico substituído (Equação 13), onde K_x é a constante de ionização do ácido benzoico substituído, K_0 é a constante de ionização do ácido benzoico, σ a constante do grupo introduzido e ρ a constante da reação¹⁶⁰.

$$\log K_x = \rho\sigma + \log K_0 \quad (13)$$

Analogamente ao parâmetro de Hammett, Hansch introduziu o parâmetro hidrofóbico π , que é calculado pela diferença entre o logaritmo do coeficiente de partição octanol/água da molécula com o substituinte e o logaritmo do coeficiente de partição do mesmo composto sem o substituinte (Equação 14)¹⁶¹.

$$\pi = \log P_x - \log P_H \quad (14)$$

Outros modelos foram propostos para modelar de forma quantitativa a relação estrutura atividade, como o modelo quadrático¹⁶² proposto por Hansch, o modelo linear de Free-Wilson¹⁶³ e o modelo bilinear¹⁶⁴ de Kubinyi. Devido ao grande número de descritores disponíveis atualmente a interpretação de um modelo linear pode tornar-se difícil embora modelos mais precisos possam ser desenvolvidos. Dessa forma uma equação geral para modelar a atividade biológica pode ser representada por:

$$\log\left(\frac{1}{C}\right) = \sum_i \beta_i V_i + \beta_0 \quad (15)$$

onde β_i e β_0 representam os parâmetros da regressão e V_i o valor do descritor empregado no modelo.

1.5.4.1. *Descritores moleculares*

Para que as propriedades moleculares de um determinado composto possam ser manipuladas e analisadas faz-se necessário o emprego de descritores moleculares, que podem ser definidos como valores numéricos obtidos de forma lógica e matemática que extraem as informações contidas em uma representação da estrutura molecular ou um valor obtido de forma experimental padronizada¹⁶⁵.

Atualmente estão disponíveis milhares de descritores moleculares os quais podem ser classificados em descritores de solubilidade, lipofílicos, eletrônicos, estéricos, constitucionais, topológicos, geométricos, eletrostáticos, químico-quânticos, dentre outros (Tabela 1)¹⁵⁸.

Tabela 1 – Classes e exemplos de descritores empregados em estudos de QSAR.

Classe	Exemplo
Solubilidade	Solubilidade Molar (S)
	Solubilidade fração molar (X)
	Coefficientes de atividade ($\text{Log}\gamma_w$)
	Parâmetros de solubilidade Hildebrand (δ_H)
Lipofílicos	$\text{Log } P_{o/a}$
	$\text{Log } D$
	R_m (TLC)
	$\text{Log } K'$, $\text{Log}K_w$ (RPLC)
	Constante do substituinte de Hansch (π)
Eletrônicos	Constante fragmental de Rekker's (f)
	Constante de ionização ($\text{p}K_a$)
	Constante de Hammett (δ)
	Constante polar de Taft (δ^*)
	Componentes indutivo e de ressonância de Taft (δ_1 , δ_R)
	Momentos de dipolo
Estéricos	Parâmetros de ligação de hidrogênio
	Parâmetro estérico de Taft (E_s)
	Refratividade Molar (RM)
	Parachor
	Parâmetro estérico de Charton (ν)
Constitucionais	Parâmetros de van der Waal's
	Número total de átomos
	Número individual de tipos de átomos
	Número total de ligações

Topológicos	Número de tipos individuais de ligação
	Número de anéis
	Massa molecular
	Peso atômico médio
	Índice de Wiener (W)
	Índices de Randić
	Índices de conectividade de Kier e Hall (X)
	Índices de forma de Kier
	Índice de Flexibilidade de Kier
	Índice de Balaban (J)
	Índices de conteúdo de informação (IC)
	Índices de forma de Kappa
	Complexidades topológicas
Geométricos	Índice de conectividade ecêntrica
	Índice Detour
	Momentos principais de inércia
	Volume molecular
	Área superficial molecular
	Índices de Shadow
Eletrostáticos	Área molecular acessível ao solvente
	Índice de gravitação
	Cargas parciais máximas e mínimas da molécula
Químico-quânticos	Parâmetros de polaridade
	Área superficial parcialmente carregada (CPSA)
	Descritores relacionados à distribuição de carga
	Energia HOMO-LUMO
	Densidade eletrônica dos orbitais
	Superdeslocalabilidades
	Polarizabilidades átomo-átomo
	Polarizabilidades moleculares
Diversos	Energias moleculares quânticas
	Deslocamentos químicos: ^1H , ^{13}C (δ_{ppm})
	Frequências no infravermelho (ν)
	Tensão superficial

1.5.4.2. Métodos em QSAR

A primeira ferramenta estatística empregada no desenvolvimento de modelos de QSAR foi a regressão linear múltipla (MRL, do inglês *Multiple Linear Regression*), no qual a atividade biológica de uma série de compostos análogos é expressa como uma combinação linear de descritores moleculares¹⁶⁶. Esse princípio é a base dos trabalhos pioneiros de Hansch, no qual a atividade biológica é explicada por meio de coeficientes obtidos por regressão linear

múltipla, coeficientes estes, que ponderam as propriedades hidrofóbicas e eletrônicas no modelo (Equação 16).

Em um modelo de QSAR obtido por regressão linear múltipla (Equação 16) a atividade biológica a ser explicada é a variável dependente (\hat{Y}) e os descritores moleculares empregados para descreverem a atividade biológica são as variáveis independentes (X_1 , X_2 e X_k)¹¹².

$$\hat{Y} = b_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_k X_k \quad (16)$$

Os índices β_0 , β_1 , β_2 e β_k são os parâmetros obtidos pela regressão linear que ponderarão as variáveis independentes¹⁶⁷. Esses índices, são obtidos por meio do método dos mínimos quadrados, que consiste em estabelecer os valores de β_0 , β_1 , β_2 e β_k que minimizam o quadrado dos desvios entre os valores experimentais da variável dependente (Y_i) e os valores preditos (\hat{Y}_i) (Equação 17)¹⁶⁷.

$$\sum_{i=1}^n (Y_i - \hat{Y}_i)^2 \quad (17)$$

O uso direto de descritores moleculares como variáveis independentes em modelos de QSAR que empregam a MRL como ferramenta estatística, está limitado ao número de descritores que podem ser empregados na construção desses modelos e na exigência que as variáveis independentes possuam baixa correlação entre si^{167, 168}. Uma forma de contornar essas limitações é o uso da regressão das componentes principais (PCR, do inglês *Principal Component Regression*), nesse método os descritores moleculares são combinados entre si gerando um menor número de variáveis independentes, as componentes principais, que possuem baixa correlação entre si, pois são ortogonais¹⁶⁹.

1.5.5. Estudo *in silico* das propriedades ADME/Tox

Os efeitos terapêuticos e tóxicos dos fármacos nos sistemas biológicos estão relacionados à sua capacidade de interação com moléculas alvos (receptores)

no organismo, sendo a investigação desses efeitos e o seu mecanismo de ação os objetivos centrais da farmacodinâmica⁷.

Além da interação fármaco-receptor, outros processos estão envolvidos na ação farmacológica de uma determinada substância, como a absorção, distribuição, metabolização e excreção, processos estes, objetos de estudo da farmacocinética, a qual pode ser definida como uma ferramenta de descrição quantitativa que visa modelar o que o corpo faz ao fármaco administrado¹⁷⁰. Os processos farmacocinéticos são comumente referidos de forma abreviada como propriedades ADME (**a**bsorção, **d**istribuição, **m**etabolização e **e**xcreção^{14, 171}.

Para que um determinado fármaco administrado por via oral desencadeia atividade farmacológica pretendida, deverá atravessar o tecido epitelial do trato gastrointestinal para que possa ser absorvido e penetrar na circulação sistêmica¹⁷¹. Para que esse processo de absorção ocorra, o fármaco deverá passar por barreiras como a membrana plasmática das células do tecido epitelial, ser estável aos mecanismos de degradação enzimática contidos nos enterócitos e na microflora intestinal, além de resistir a sistemas de efluxo como a glicoproteínas-P, que reduz o acúmulo intracelular do fármaco e/ou o fluxo transcelular¹⁷¹.

No processo de distribuição, o fármaco é transferido da circulação sistêmica para diversos tecidos e fluídos corporais, como o líquido cefalorraquidiano e fluidos intersticiais, por meio da difusão passiva da forma neutra, para a maioria dos fármacos¹⁷¹. Concomitante à distribuição, o fármaco estará sendo removido da circulação sistêmica principalmente pela metabolização no fígado e excreção pelos rins, seguindo tipicamente uma cinética de primeira ordem¹⁷².

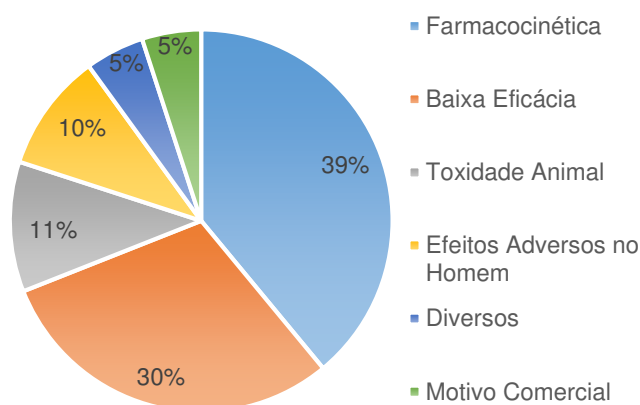
Para descrever os processos ADME estão disponíveis parâmetros farmacocinéticos como absorção intestinal, biodisponibilidade oral, “clearance”, volume de distribuição, meia-vida plasmática e concentração plasmática máxima, além de fatores que interferem nesses parâmetros, como ligação às proteínas plasmáticas, inibição da glicoproteína P, solubilidade, lipofilicidade e massa molecular¹⁷².

No processo de desenvolvimento de novos fármacos o emprego da farmacocinética pré-clínica permite uma melhor compreensão sobre o perfil da molécula candidata a ser selecionado para fases posteriores do processo, permitindo desta forma, uma seleção e otimização do regime terapêutico¹⁷⁰.

Com o intuito de aumentar as taxas de sucesso no processo de desenvolvimentos de novos fármacos, estudos farmacocinéticos guiados por computador aliados aos recursos experimentais, vêm sendo empregados cada vez mais cedo no processo de desenvolvimento de novos fármacos, utilizando para isso modelos quantitativos e filtros para a seleção de compostos com perfil ADME favorável¹⁷³⁻¹⁷⁶.

Um dos motivos dessa introdução precoce dos estudos farmacocinéticos é o fato de que a maioria das falhas no processo de desenvolvimento de novos fármacos tem sido atribuído à farmacocinética inadequada dos candidatos, a qual responde por 39% do total de falhas, seguido por 30% devido à baixa eficácia e 11% pela toxicidade animal (Figura 13)¹⁷⁷.

Figura 13. Principais causas de falhas em projetos de desenvolvimento de fármacos. **Fonte:** Kennedy (1997)¹⁷⁷.



Um dos primeiros princípios desenvolvidos para estabelecer correlação entre características estruturais moleculares com suas respectivas absorções/permeações fora desenvolvida por Lipinski e colaboradores, a chamada “regra dos cinco” (do inglês “*rule of five*”)^{175, 178}. Esta regra foi elaborada com base em dados de absorção oral humana de 2245 compostos disponíveis no *Word Drug Index*^{175, 178}. De acordo com essa regra, para que uma molécula tenha potencial para ser absorvida oralmente deverá seguir aos seguintes critérios:

- Número de doadores de hidrogênio ≤ 5 (soma de OH e NH);
- Número de aceptores de hidrogênio ≤ 10 (soma de O e N);

- $\text{Log } P \leq 5$;
- Massa molecular $\leq 500 \text{ g mol}^{-1}$.

O termo “regra dos cinco” é devido ao fato de os valores de todos os critérios serem múltiplos de cinco e essa regra fora concebida para não ser aplicável à moléculas que são substratos de transportadores biológicos^{175, 178}.

Outro estudo agora desenvolvido por Veber e colaboradores, empregando dados de biodisponibilidade oral de 1100 candidatos a fármacos confirmou o papel preditivo de três das quatro regras de Lipinski (número de doadores de hidrogênio, número de aceptores de hidrogênio e $\log P$), porém não houve correlação entre a massa molecular e a biodisponibilidade oral¹⁷⁶. Além disso, dois novos parâmetros foram introduzidos por Veber: o número de ligações rotacionáveis (nrot) e a área superficial polar (PSA). Este estudo sugere que para um candidato a fármaco ter uma boa biodisponibilidade oral em rato, deverá atender a somente dois critérios:

- Número de ligações rotacionáveis ≤ 10 ;
- Área superficial polar $\leq 140 \text{ \AA}^2$ ou o número de doadores e aceitadores de hidrogênio ≤ 12 .

Além das regras estabelecidas para se aumentar a probabilidade na descoberta de compostos ativos por via oral, modelos quantitativos têm sido desenvolvidos nos últimos anos visando uma prévia análise do perfil farmacocinético de moléculas que ainda não foram sintetizadas^{174, 179-182}. Porém, vários desses modelos apresentam problemas com suas previsibilidades^{179, 183, 184}.

Um modelo de holograma QSAR desenvolvido e validado por Moda e colaboradores¹⁸⁰, empregando 250 fármacos de uso clínico, demonstrou eficiência na previsão da biodisponibilidade de um grupo teste formado por 52 fármacos, apresentando um coeficiente de determinação igual a 0,93 para o grupo treino e 0,85 para o grupo teste. Além disso, esse modelo possui a vantagem de ser usado por meio de um serviço *online* gratuito para previsão da biodisponibilidade de novas moléculas. A previsibilidade para produtos naturais

deste modelo, deve ser realizada com cautela, pois tanto o grupo treino quanto o teste são compostos principalmente por fármacos sintéticos ou semi-sintéticos.

O mesmo grupo fornece serviços para predição de absorção intestinal humana, ligação as proteínas plasmáticas, penetração na barreira hematoencefálica, inibição da glicoproteína P e solubilidade em água, empregando para isso, modelos validados^{181, 182, 185}.

A solubilidade de um candidato à fármaco é uma das mais importantes propriedades físico-químicas no processo de desenvolvimento de fármacos, pois substâncias insolúveis têm impacto negativo na absorção e biodisponibilidade oral, na administração parenteral, nos resultados de bioensaios e no tempo e custo final da formulação¹⁷².

Para avaliar o potencial como fármaco de determinadas moléculas, por meio de suas solubilidades, lipofilicidades e áreas superficiais polares, diversos modelos foram desenvolvidos para prever estas propriedades, estando muito desses modelos acessíveis em servidores online como o ALOGPS e Molinspiration ou inclusos nas versões livres de pacotes comerciais como o ChemSketch e Marvin¹⁸⁵⁻¹⁸⁷.

A toxicidade é a terceira causa de falhas no processo de desenvolvimento de fármacos, sendo responsável por 11% do total dessas falhas (Figura 13)¹⁷⁷. Para aumentar a identificação cada vez mais cedo de moléculas com toxicidade potencial nos processos de desenvolvimento de fármacos, métodos teóricos de previsão de toxicidade têm sido empregados juntamente com o perfil ADME, gerando o chamado perfil ADME/Tox¹⁸⁸⁻¹⁹⁰. Diversos programas comerciais de previsão de toxicidade estão disponíveis como TOPKAT, CASE, DEREK, HazardExpert, OncoLogic, e COMPACT¹⁹¹.

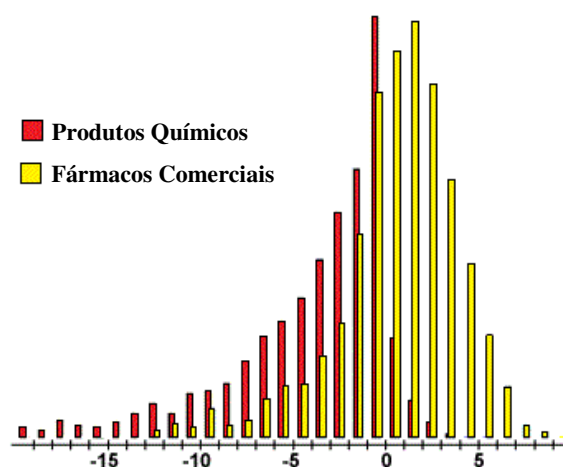
Um serviço gratuito online de previsão de toxicidade é disponibilizado por três servidores (organic-chemistry.org, cheminformatics.ch e rdchemicals.com), o OSIRIS Property Explorer, uma ferramenta desenvolvida pela *Actelion Pharmaceutical Ltd.* Para avaliar o perfil toxicológico de uma determinada estrutura química empregando o OSIRIS®, a mesma deverá ser editada, em seguida o programa exibirá no canto superior direito da janela as propriedades toxicológicas: mutagenicidade, tumorigenicidade, potencial irritante e efeitos reprodutivos.

A previsão da toxicidade empregando o OSIRIS® se dá por meio de um banco de dados de fragmentos moleculares pré-computados que originarão alertas de toxicidades caso estes fragmentos sejam encontrados na estrutura de interesse. Para avaliar a confiabilidade na previsão, um grupo de moléculas sabidamente mutagênica e outro de fármacos comerciais foram empregados. No grupo de moléculas mutagênicas o programa identificou 86% delas como potencialmente mutagênicas e no grupo formado por fármacos comerciais apenas 12% foram identificadas como prejudiciais. Além dessas propriedades, outras informações podem ser obtidas como cLogP, solubilidade, massa molecular e perfil fármaco-similar (do inglês “*drug-likeness*”).

O perfil fármaco-similar disponível no OSIRIS® é uma pontuação que indica o quão a estrutura de interesse possui similaridade estrutural a fármacos comerciais ou a produtos químicos. A escala fármaco-similar compreende uma faixa de valores positivos e negativos. Sendo que valores positivos indicam moléculas com bom perfil fármaco-similar e valores negativos estruturas com características de produtos químicos. A pontuação é calculada através de fragmentos gerados por meio de um banco de dados, composto por 3300 fármacos comerciais e 15000 produtos químicos contidos no catálogo Fluka. O diagrama de distribuição demonstra que 80% dos fármacos possuem valores positivos na pontuação fármaco-similar e a maioria dos produtos químicos da Fluka apresentam valores negativos (Figura 14).

Outro índice de similaridade disponível no *OSIRIS Property Explorer*, é *Drug-Score*, um indicador mais amplo de similaridade a fármacos, que engloba além da similaridade estrutural (*Drug-Score*), características de lipofilia, solubilidade, massa molecular e riscos de toxicidade. Os valores de *Drug-Score* variam entre 0 e 1, estando os compostos com perfil similar à fármacos próximos a 1 na escala *Drug-Score*.

Figura 14. Histograma da distribuição de frequência do perfil fármaco-similar de produtos químicos contidos no catálogo Fluka® (vermelho) e fármacos comerciais (amarelo).



A toxicidade cardíaca tem merecido destaque nos processos de P&D de fármacos dos últimos anos, visto que fármacos de sucesso como terfenadine e cisaprida foram removidos do mercado devido a efeitos colaterais cardíacos letais¹⁹². Na maioria dos casos os efeitos cardiotoxicos estavam relacionados à arritmias ocasionadas pela interação do fármaco com um canal de potássio cardíaco denominado hERG¹⁹². Diante desses fatos, estudos de sensibilidade ao canal hERG são sugeridos na etapa pré-clínica, antes da submissão do fármaco para agências regulatórias¹⁹³.

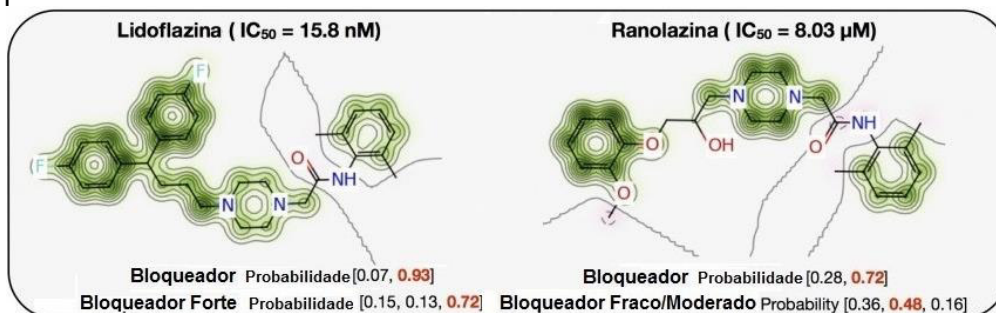
Métodos *in vitro* e *in silico* têm sido empregados nos estudos de interação entre candidatos a fármacos e o canal hERG, sendo a integração entre estes métodos, recomendada para previsão dos riscos de arritmia de um determinado fármaco¹⁹⁴. Os métodos *in silico* para estudos do bloqueio do canal hERG podem ser empregados na priorização dos compostos a serem testados *in vitro*, devido ao seu melhor desempenho na identificação de compostos inativos visto que, existem mais informações sobre não bloqueadores que bloqueadores¹⁹⁵.

Diversos modelos foram desenvolvidos para a previsão do bloqueio do canal hERG empregando QSAR¹⁹⁶⁻¹⁹⁸, modelos baseados em regras¹⁹⁹, no aprendizado de máquinas^{200, 201}, baseados em homologia^{202, 203}, farmacofóricos²⁰⁴ e modelos computacionais para a eletrofisiologia cardíaca²⁰⁵.

Um modelo quantitativo para o bloqueio do canal hERG desenvolvido e validado por Braga e colaboradores empregando dados de 11.958 compostos

disponíveis no ChEMBL apresentou elevada precisão na identificação de bloqueadores e não-bloqueadores do canal hERG, com probabilidade de precisão variando de 83% a 93% do conjunto de teste²⁰⁶. Além disso, este modelo é disponibilizado em um servidor online gratuito para uso da comunidade científica (<http://labmol.farmacia.ufg.br/predherg>).

Figura 15. Mapa de probabilidade para o modelo de previsão da atividade bloqueadora do canal hERG.



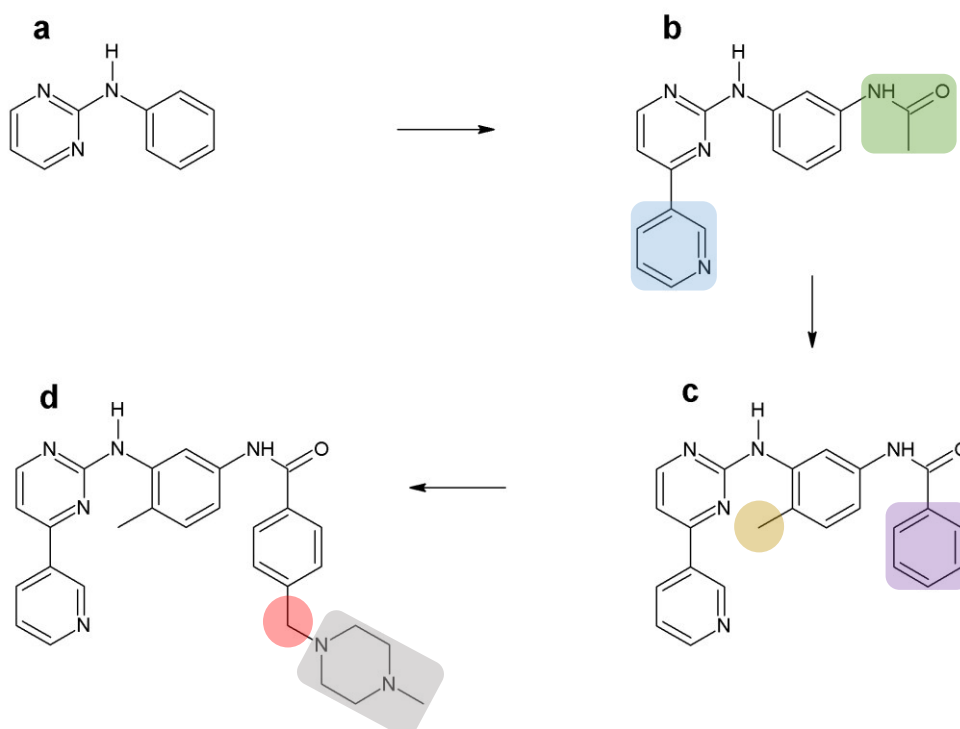
Linhas verdes – contribuição positiva, linhas rosas – contribuição negativa. Figura reproduzida com permissão do Laboratório de Planejamento de Fármacos e Modelagem Molecular da Universidade Federal de Goiás.

O uso do Pred-hERG é simples e inicia-se com a introdução da molécula no formato SMILE, e em seguida após “clique” o ícone Predict (2x for Maps), duas classes de valores de probabilidade previstos são apresentadas, a primeira relativa ao modelo binário que irá distinguir entre bloqueadores e não-bloqueadores, e a segunda irá classificar a estrutura em bloqueador fraco, intermediário ou forte (Figura 15). Um segundo “click” sobre o ícone Predict (2x for Maps) fornecerá a contribuição de cada fragmento ou átomos para a atividade de bloqueio do canal hERG por meio de linhas de contorno sobre a molécula que indicarão a contribuição positiva através de linhas verdes e negativa por meio de linhas rosas (Figura 15).

Durante um projeto de desenvolvimento de anti-neoplásicos nos laboratórios Ciba-Geigy (agora Novartis), fenilaminopirimidinas foram identificadas como potentes inibidores da autofosforilação do receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF-R) e da proteína quinase C (PKC) (Figura 16a)²⁰⁷,

Com a finalidade de melhorar o perfil farmacodinâmico e farmacocinético, modificações estruturais fizeram-se necessárias. Inicialmente, observou-se que a introdução do grupo piridinil na posição 3 da piridina e da amida ligada à fenila (Figura 16b) aumentava a atividade tanto para PDGF-R quanto para PKC²⁰⁷.

Figura 16. Modificações estruturais para otimização farmacocinética e farmacodinâmica no desenvolvimento do imatinib.



O perfil inibitório desses compostos frente a outras quinases foi avaliado e uma inibição da v-Abl quinase foi observada²⁰⁹. A v-Abl quinase está envolvida

na patogênese da Leucemia Mieloide Crônica e sua inibição foi avaliada como uma possível estratégia farmacológica para o tratamento dessa discrasia.

Estudos de estrutura-atividade demonstraram que a introdução da metila no anel diaminofenílico (Figura 16c) exclui a atividade frente a PKC e aumenta a inibição frente a v-Abl quinase e a introdução da fenila na amida aumenta a inibição da v-Abl quinase^{207, 209}. Para contornar problemas de solubilidade e biodisponibilidade, o grupo N-metilpiperazina foi introduzido e um espaçador (CH₂) entre este grupo e a fenila fez-se necessário (Figura 16d), para evitar o potencial mutagênico das arilaminas⁵.

É importante ressaltar que a descoberta do imatinib foi baseada inicialmente em testes *in vitro* e não *in silico*, visto que a primeira estrutura da Abl quinase foi elucidada 8 anos após a síntese do imatinib, sendo desta forma um exemplo de fármaco descoberto através do planejamento racional baseado na estrutura do receptor, empregando-se testes *in vitro* durante os estágios iniciais de desenvolvimento^{209, 210}.

Para validar o potencial terapêutico do imatinib, foram desenvolvidos estudos em células superexpressando o gene Bcr-Abl, os quais demonstraram a capacidade antiproliferativa do imatinib tanto *in vitro* quanto *in vivo*, além de não interferir em células Bcr-Abl negativas²¹¹. Após a fase pré-clínica, estudos clínicos foram conduzidos em 38 indivíduos com leucemia mielóide crônica (LMC) e em 20 portadores da leucemia linfoblástica aguda cromossomo Filadélfia positivo (LLA Ph⁺)²¹².

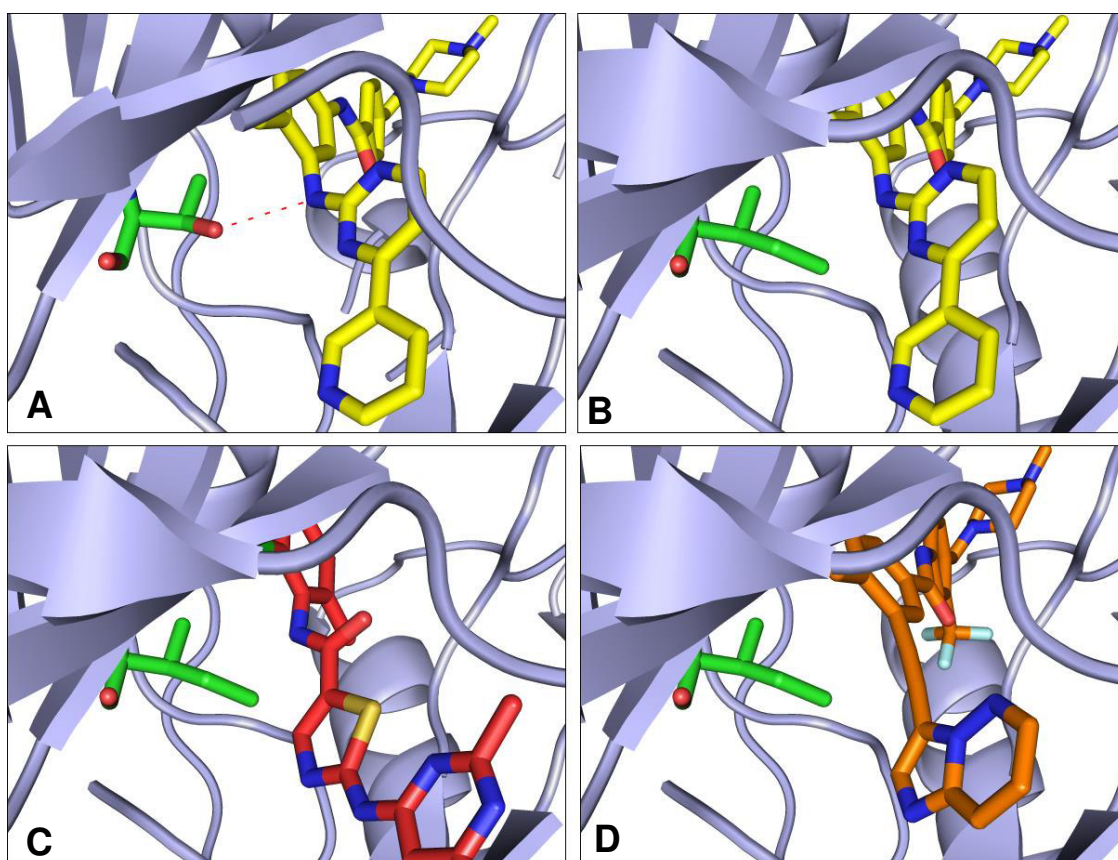
Dos 38 pacientes com LMC em crise blástica, 21 apresentaram resposta ao tratamento e 4 dos 21 apresentaram uma remissão hematológica completa. Dos 20 pacientes com LLA Ph⁺, 14 apresentaram resposta e 4 deles também apresentaram respostas completas. Neste estudo, o imatinib demonstrou-se bem tolerável, sendo os efeitos adversos gastrointestinais e hematológicos os mais frequentes²¹².

Os testes clínicos também demonstraram que muitos pacientes que estão na fase avançada e são inicialmente responsivos ao imatinib, tornam-se resistentes ao mesmo, devido principalmente a mutações pontuais que levam a substituição de aminoácidos do sítio de ligação ao imatinib²¹³.

A mutação pontual mais frequente, é a permuta da treonina 315 pela isoleucina (mutação referida como T315I) que elimina uma ligação de hidrogênio

favorável entre a treonina e o imatinib, além de impor um impedimento estérico devido à cadeia lateral volumosa da isoleucina, ocasionando uma perda de potência em torno de 20 vezes (Figura 17A e B)²¹⁴⁻²¹⁶.

Figura 17. Complexos entre a Abl quinase selvagem e mutante com os inibidores imatinib, dasatinib e ponatinib. **A** – Imatinib complexado Abl quinase selvagem, **B** – Imatinib complexado à Abl quinase^{T315I}, **C** – Dasatinib complexado à Abl quinase^{T315I}, **D** – Ponatinib complexado à Abl quinase^{T315I}. A treonina e a isoleucina 315 são apresentadas como bastões verdes. Fonte: A figura foi gerada através dos códigos PDB: 2GQG, 3CS9, 2HYY E 30Y3.

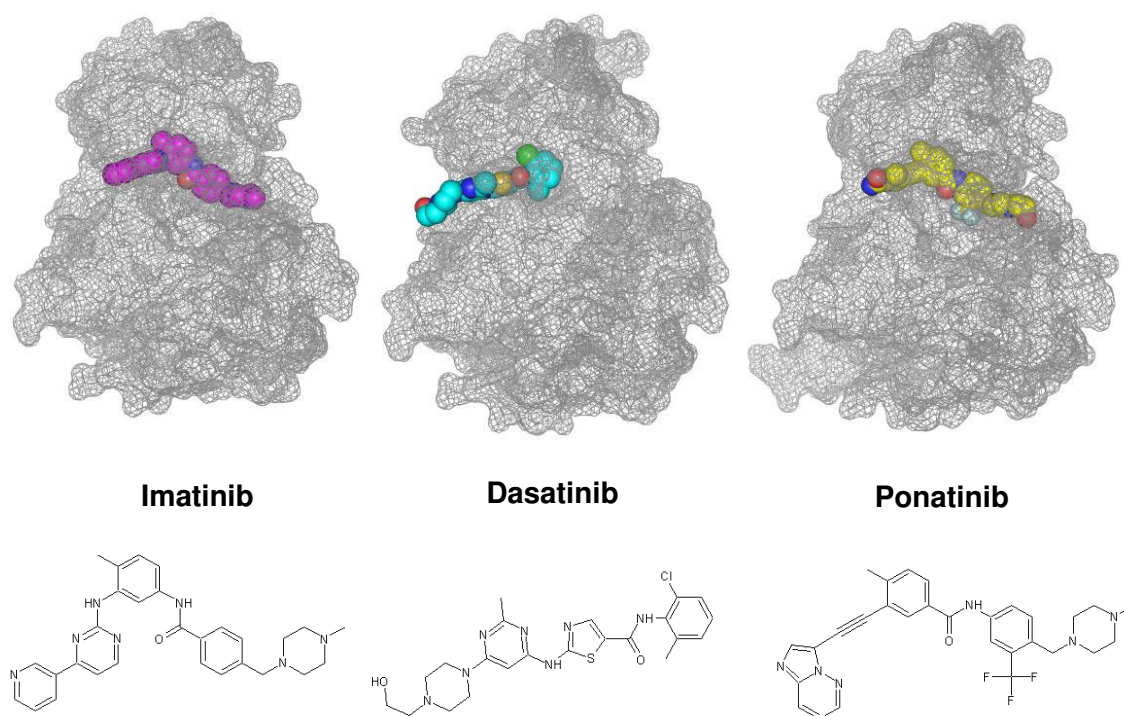


Com o aparecimento da resistência ao imatinib, surgiu a necessidade de desenvolver novos antagonistas capazes de inibir além da forma selvagem, as principais mutações. Este processo de desenvolvimento foi intensamente baseado na análise dos modos de interação entre os inibidores e a Abl quinase selvagem e mutada, além de estudos de relação estrutura atividade²⁰⁸.

O primeiro inibidor de segunda geração da Abl quinase desenvolvido, fora o dasatinib (Figura 17B), 375 vezes mais potente que o imatinib é ativo contra 14 das 15 mutações da Abl quinase, sendo a mutação T315I a única insensível ao

mesmo²⁰⁸. A introdução do anel aminotiazólico no dasatinib não impede o contato estérico com a isoleucina 315 da Abl quinase^{T315I} (Figura 17C).

Figura 18. Diferentes formas de ligação dos inibidores imatinib, dasatinib e ponatinib ao sítio de ligação ao ATP da Abl quinase. **A** – Os inibidores estão esboçados como um conjunto de esferas e a superfície da enzima como malhas em cinza. **B** – Fórmulas estruturais dos inibidores imatinib, dasatinib e ponatinib.



O desenvolvimento do dasatinib foi direcionado para a porção conservada do sítio de ligação ao ATP, uma região menos susceptível às mutações, além de ocupar parte da cavidade hidrofóbica através de sua porção 2-cloro-6-metilfenil (Figura 18), diferentemente do imatinib, que possui uma maior complementariedade com este bolsão hidrofóbico (Figura 18)²⁰⁸.

A necessidade de inibidores eficientes contra a mutação T315I culminou na descoberta do ponatinib (Figura 18), o primeiro inibidor de uso clínico eficaz contra a mutação T315I. Sua gênese foi baseada em métodos computacionais e no planejamento baseado na estrutura do receptor²¹⁷. É estruturalmente relacionado ao imatinib (Figura 18), diferindo na presença da trifluorometila, e do anel imidazol-piridazínico conectado ao restante da molécula pelo grupo etinil. Este grupo é responsável pela sensibilidade do mutante T315I ao ponatinib, pois

seu menor volume evita o contato estérico com a isoleucina 315 (Figura 17D)^{218, 219}.

Além dos inibidores da Abl quinase, outras classes de fármacos em uso clínico se tiveram sua gênese baseada no planejamento racional com base na estrutura do receptor, sejam empregando métodos *in vitro* e/ou *in silico*. A exemplo, os inibidores da neuramidase, zanamivir e oseltamivir, empregados no tratamento de infecções causadas pelo vírus influenza²²⁰⁻²²³.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Planejar, com o auxílio de métodos computacionais, antibacterianos inibidores da enzima diidrofolato redutase do *Staphylococcus aureus* com propriedades farmacodinâmicas, farmacocinéticas e toxicológicas teóricas promissoras a partir de uma série de diaminoquinazolinas.

2.2. Objetivos Específicos

- ✚ Identificar os aminoácidos flexíveis do sítio ativo da DHFR do *Staphylococcus aureus*;
- ✚ Correlacionar a estrutura de uma série de diaminoquinazolinas com as mudanças conformacionais induzidas por estas no sítio ativo da DHFR do *Staphylococcus aureus*;
- ✚ Estabelecer a conformação mais estável e a energia de ligação das formas neutras e protonadas de uma série de diaminoquinazolinas no sítio ativo da DHFR do *Staphylococcus aureus* por meio de docagem molecular;
- ✚ Identificar as principais interações entre as diaminoquinazolinas e os aminoácidos do sítio ativo da DHFR do *Staphylococcus aureus*;
- ✚ Calcular os valores de descritores quânticos e clássicos de uma série de diaminoquinazolinas;
- ✚ Elaborar e validar um modelo de QSAR para previsão da constante de inibição (K_i) de uma série de diaminoquinazolinas frente a enzima DHFR do *Staphylococcus aureus*;
- ✚ Propor novos inibidores da DHFR do *Staphylococcus aureus* empregando modelos de QSAR validados;
- ✚ Avaliar o perfil farmacocinético e toxicológico teóricos das diaminoquinazolinas mais promissoras bem como dos análogos propostos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. PARTE I – DOCAGEM MOLECULAR

3.1.1. *Análise dos aminoácidos flexíveis e do encaixe induzido*

Para a identificação dos aminoácidos flexíveis do sítio ativo da SaDHFR foram selecionadas seis estruturas cristalográficas de melhor resolução depositadas no *Protein Data Bank* (www.rcsb.org) com os seguintes códigos de identificação e resoluções: 3SR5 (1,68Å), 3SRQ (1,69Å), 3SRR (1,70 Å), 3SRS (1,70Å), 3SRU (1,70Å), 3SRW (1,70Å). De posse das estruturas cristalográficas utilizou-se o programa de modelagem molecular Pymol® (www.pymol.org) para realizar o alinhamento das estruturas e a posterior inspeção visual dos aminoácidos flexíveis. Após o alinhamento realizou-se também o estudo das mudanças conformacionais induzidas pelos ligantes no sítio ativo da enzima e a ocorrência de moléculas de água conservadas nas estruturas cristalográficas.

3.1.2. *Preparo do receptor*

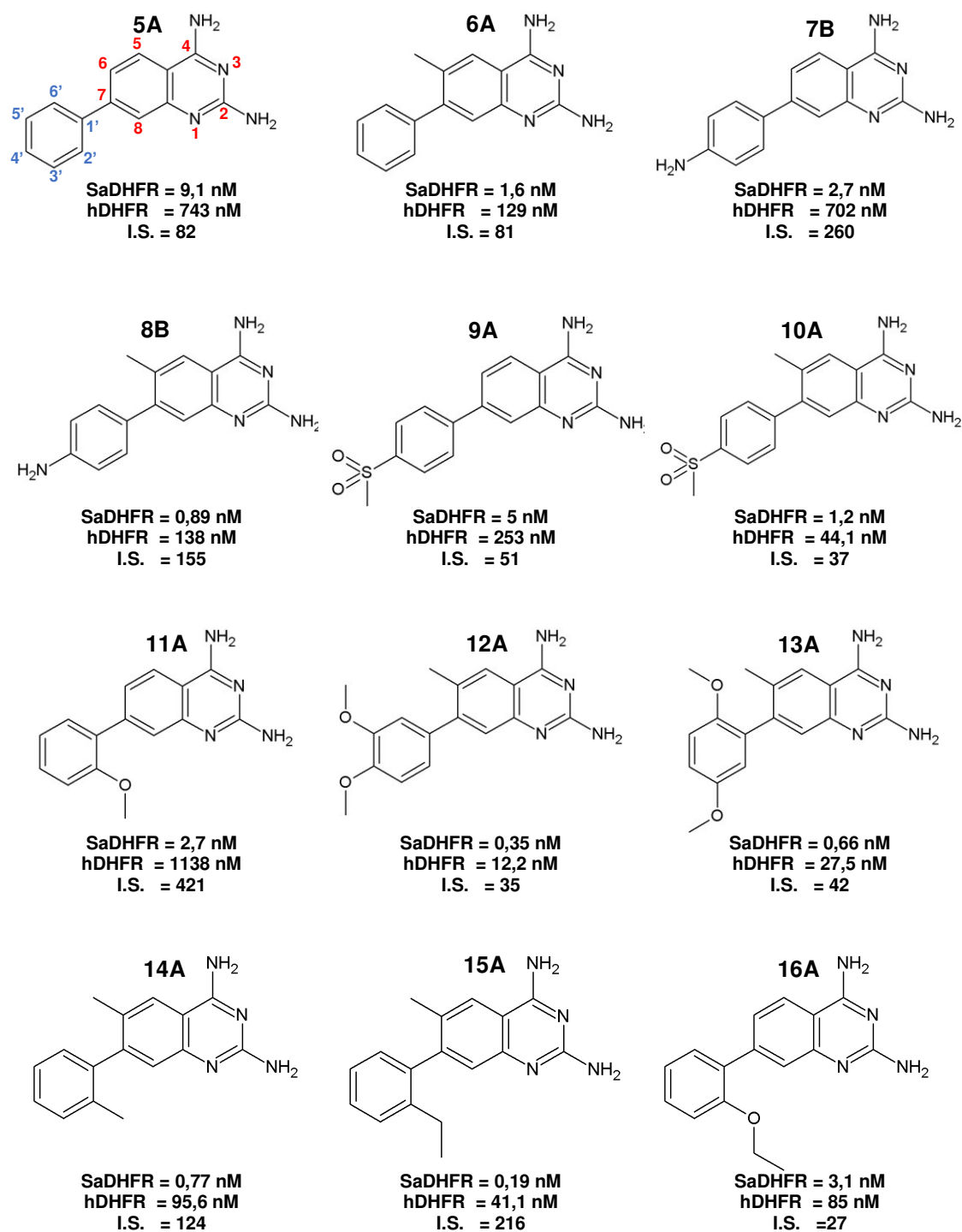
Para a docagem, utilizou-se a estrutura cristalográfica de código 3SRU e resolução 1,70Å.

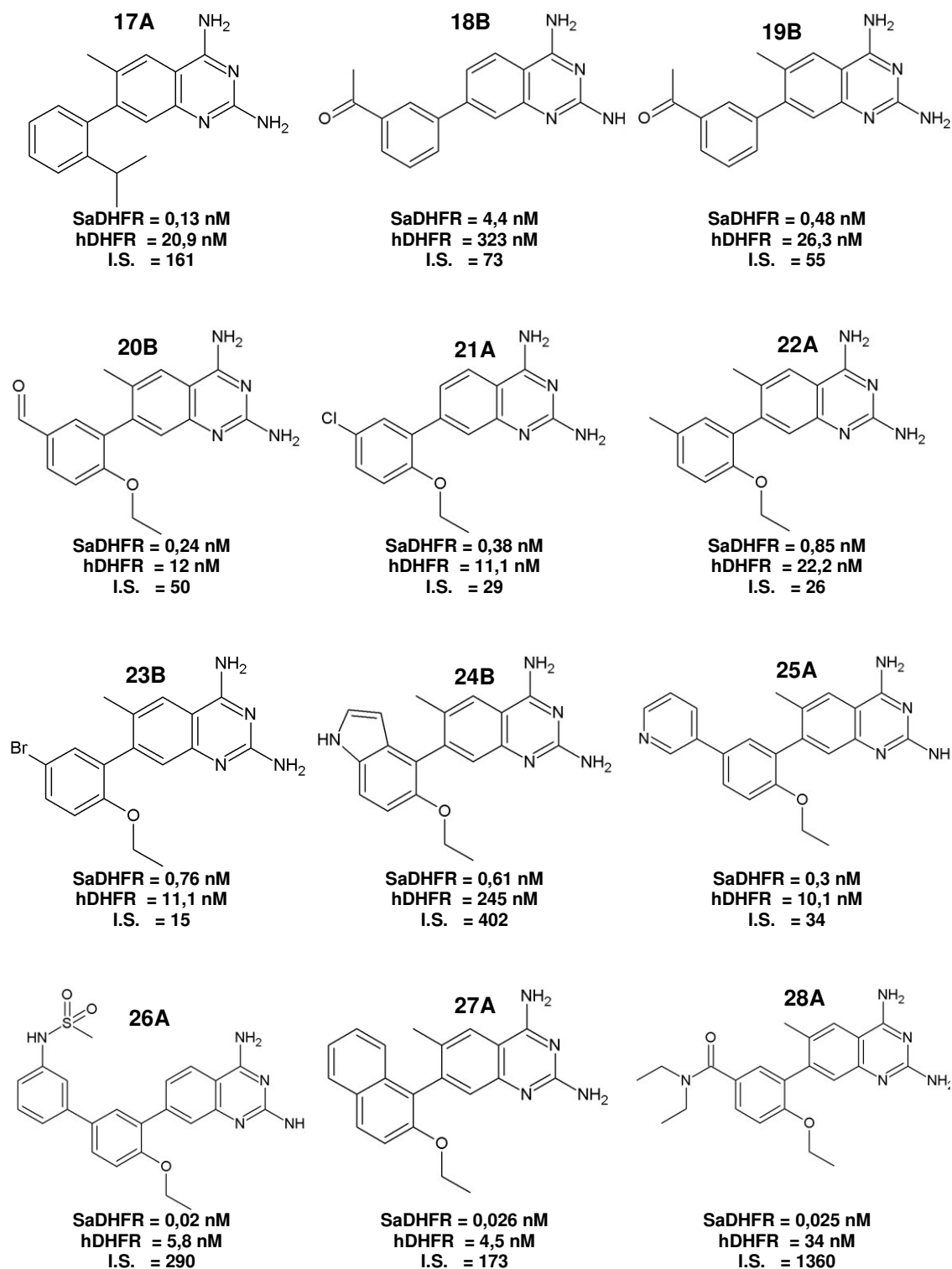
Antes do processo de docagem molecular os hidrogênios foram adicionados na estrutura cristalográfica e as moléculas de água removidas exceto as águas W1, W177, W237 e W268. O aspartato 28 foi editado com carga parcial -1.

3.1.3. *Obtenção e preparo dos ligantes*

Os ligantes empregados no presente estudo compreendem uma série de 24 diaminoquinazolininas (Figura 19) com valores de constante de inibição (K_i) medidos contra a diidrofolato redutase do *Staphylococcus aureus* e humana disponível na literatura¹⁰¹.

Figura 19 – Atividade e seletividade da série de diaminoquinazolininas usadas no presente estudo. **Fonte:** Li (2011)¹⁰¹.





As estruturas dos ligantes foram editadas e pré-otimizadas com o programa ChemSketch®, o qual emprega uma versão modificada do campo de força CHARMM²²⁴.

3.1.4. Redocagem molecular

No processo de redocagem molecular o ligante co-cristalizado na estrutura cristalográfica PDB 3SRU foi removido e a docagem molecular realizada para reposicioná-lo na conformação experimental. As condições e os parâmetros usados na redocagem foram idênticas às empregadas na docagem dos demais ligantes. A raiz quadrada do desvio médio (RMSD) entre os átomos pesados das conformações cristalográficas e docadas (poses), foi calculada com o programa VMD 1.9.1 (<http://www.ks.uiuc.edu>)²²⁵.

3.1.5. Simulações de docagem molecular

Com o uso do AutoDockTools 1.5.4²²⁶ cargas Gasteiger foram adicionadas aos arquivos dos ligantes e do receptor, 1018 hidrogênios não-polares foram fundidos aos seus respectivos carbonos no arquivo.

Com base nos estudos de mudança conformacional induzida pelos ligantes no sítio ativo da SaDHFR, os aminoácidos leucina 6, leucina 21, isoleucina 51 e glutamina 20 foram editados nas suas conformações de menor energia para cada ligante, por meio da biblioteca de rotâmeros Dunbrack²²⁷, disponível no programa UCSF Chimera v1.10.1¹²⁰. Durante a docagem molecular o aminoácido leucina 29 foi considerado flexível e os demais, corpos rígidos.

A docagem molecular foi realizada com o programa AutoDock 4.2¹⁴¹, o algoritmo genético Lamarckiano foi escolhido. As dimensões e as coordenadas do *grid* foram 38X40X28Å, -6.457/32.124/-4.863 respectivamente. A simulação foi realizada com uma população inicial de 150 indivíduos, 2500000 avaliações de energia, 27000 gerações, taxas de mutação e *crossover* respectivamente de 0,02 e 0,8. O algoritmo genético foi executado 50 vezes para cada ligante.

3.2. Parte II –QSAR

3.2.1. Dados enzimáticos

Os dados biológicos empregados para a construção dos modelos de QSAR, foram obtidos a partir de uma série de 24 diaminoquinazolininas (Tabela 2) obtidas na literatura¹⁰¹. A atividade inibitória desses compostos frente a enzima SaDHFR, foi expressa por meio da constante de inibição (K_i) em nanomolar¹⁰¹. Os valores de K_i foram transformados para o logaritmo do inverso da constante de inibição (Tabela 2). Os valores dos logaritmos do inverso das constantes de inibição estão distribuídos num intervalo de -0,96 a 1,70, sendo a diferença de unidades logarítmicas para esse intervalo de 2,66.

Tabela 2 – Constantes de Inibição dos ligantes frente a SaDHFR

Inibidor	K _i (nM)	log $\frac{1}{K_i}$ (nM)	Inibidor	K _i (nM)	log $\frac{1}{K_i}$ (nM)
	SaDHFR			SaDHFR	
5A	9,10	-0,96	17A	0,13	0,89
6A	1,60	-0,20	18B	4,40	-0,64
7B	2,70	-0,43	19B	0,48	0,32
8B	0,89	0,05	20B	0,24	0,62
9A	5,0	-0,70	21A	0,38	0,42
10A	1,20	-0,08	22A	0,85	0,07
11A	2,70	-0,43	23B	0,76	0,12
12A	0,35	0,46	24B	0,61	0,21
13A	0,66	0,18	25A	0,30	0,52
14A	0,77	0,11	26A	0,02	1,70
15A	0,19	0,72	27A	0,026	1,59
16A	3,10	-0,49	28A	0,025	1,60

3.2.2. Grupos treino e teste

As 24 diaminoquinazolininas foram divididas nos grupos treino e teste, sendo o grupo treino composto por 17 ligantes (5/A, 6/A, 8/B, 10/A, 11/A, 12/A, 13/A, 14/A, 16/A, 18/B, 19/B, 20/B, 22/A, 24/B, 25/A, 26/A e 28/A) e o grupo teste por 7 ligantes (7/B, 9/A, 15/A, 17/A, 21/A, 23/B e 27/A). O critério para o uso de 70% dos ligantes no grupo treino foi estabelecido com base no fato de que a maioria dos modelos de QSAR desenvolvidos empregam de 50% a 70% do total de ligantes nesse grupo²²⁸. Além disso na construção dos grupos levou-se em consideração a variância das constantes de inibição nos dois grupos para evitar problemas no domínio de aplicabilidade do modelo.

3.2.3. Cálculo e seleção dos descritores

Para a construção dos modelos de QSAR foram calculados descritores geométricos, lipofílicos, eletrônicos, estéricos, topológicos, químico-quânticos, constitucionais e de solubilidade.

A análise titulométrica teórica e o cálculo dos descritores pKa, ponto isoelétrico, logP, logD, solubilidade aquosa, carga, polarizabilidade, eletronegatividade orbital, energia *Dreiding*, energia MMFF94, impedimento estérico, área mínima e máxima de projeção, raio mínimo e máximo de projeção, comprimento perpendicular à área máxima e mínima, volume de van der Waals, área superficial polar 2D e área molecular superficial foram calculados com a versão livre do programa MarvinSketch 6.3.0 contido no pacote computacional MarvinBeans 6.3.0 (www.chemaxon.com). A refratividade molar, volume molar, índice de Parachor, tensão superficial, constante dielétrica e polarizabilidade foram calculados com a versão livre do programa ChemSketch® 12.01 (www.acdlabs.com). As cargas potenciais eletrostáticas, calor de formação e energias HOMO/LUMO foram calculados através do semi-empírico AM1²²⁹ contido no pacote computacional MOPAC 2012 (www.openmopac.net). A área superficial polar topológica foi calculada pelo método disponível no servidor online Molinspiration (www.molinspiration.com)¹⁸⁶. Os seguintes descritores foram calculados no programa comercial Cache ProjectLeader® (www.cacheresearch.com): momento de dipolo, índices de conectividade

(ordens 0,1 e 2), índices *Shape* (ordens 1, 2 e 3), índices de conectividade de valência (ordens 0, 1 e 2), cargas parciais, densidades HOMO e LUMO, densidades nucleofílica, eletrofílica e radicalar de fronteira, superdeslocabilidade nucleofílica, eletrofílica e radicalar. Para o cálculo dos descritores quânticos no Cache ProjectLeader® utilizou-se o método semi-empírico AM1.

3.2.4. Construção e validação do modelo

O modelo de QSAR foi elaborado através de regressão linear múltipla dos valores numéricos dos descritores (MRL), empregando os programas estatísticos R 3.3.1. (www.r-project.org) e RStudio 0.98.1056 (www.rstudio.com). Os descritores moleculares e atômicos foram selecionados com base em suas correlações com os valores das constantes de inibição para a SaDHFR. Os descritores mais correlacionados com as atividades biológicas foram combinados a outros descritores, formando modelos com até três variáveis independentes pouco correlacionadas. Após a elaboração do modelo de QSAR, este foi validado através da avaliação dos graus de ajuste, significância e de previsibilidade.

3.3. Parte III – Perfil ADME/Tox

3.3.1. Perfil farmacocinético teórico

O potencial teórico para uma adequada biodisponibilidade oral foi avaliado de forma qualitativa por meio das regras de Lipinski¹⁷⁸ e Veber¹⁷⁶. A análise quantitativa foi realizada através de modelos validados para biodisponibilidade oral humana¹⁸⁰, absorção intestinal humana¹⁷⁴ e ligação às proteínas plasmáticas¹⁸¹.

3.3.2. Perfil toxicológico teórico

Os potenciais mutagênico, tumorigênico, irritante e os feitos reprodutivos foram analisados por meio do OSIRIS Property Explorer, disponível em www.rndchemicals.com.

O potencial cardiotoxico dos ligantes mais promissores relacionados à inibição do canal de potássio hERG foi avaliado através do servidor Pred-hERG²³⁰, disponível em <http://labmol.farmacia.ufg.br/predherg>.

3.3.3. *Análise de similaridade*

O perfil de similaridade estrutural e físico-química a fármacos, dos ligantes mais promissores, foi avaliado através dos índices *Drug-Likeness* e *Drug-Score* usando o *OSIRIS Property Explorer* (www.rndchemicals.com).

3.4. Parte IV – Proposição de novos compostos

3.4.1. *Modificações estruturais*

Após a análise das características teóricas e experimentais da série análoga, será selecionada uma diaminoquinazolina com características promissoras para obtenção de uma série análoga proposta, empregando-se modificações estruturais, visando a otimização farmacocinética e/ou farmacodinâmica.

As regiões do inibidor escolhidas para modificações serão baseadas nos resultados da docagem molecular, priorizando-se o preenchimento de cavidades na proteína não ocupadas pelo ligante, evitando-se o impedimento estérico entre o ligante e a proteína além de modificações em regiões da molécula acessíveis ao solvente.

As modificações empregadas na proposição dos análogos, serão baseadas nos princípios da química medicinal e incluirão permuta de hidrogênio ou metil por halogênios (Cl, Br, F), trifluorometil, metoxil, carboxil e piperazil. Além de ciclizações.

3.4.2. *Análise dos análogos propostos*

Os análogos propostos serão submetidos a docagem molecular, análises ADME/Tox e ao modelo de QSAR para predição da constante de inibição, a fim de selecionar os compostos com melhores propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas.

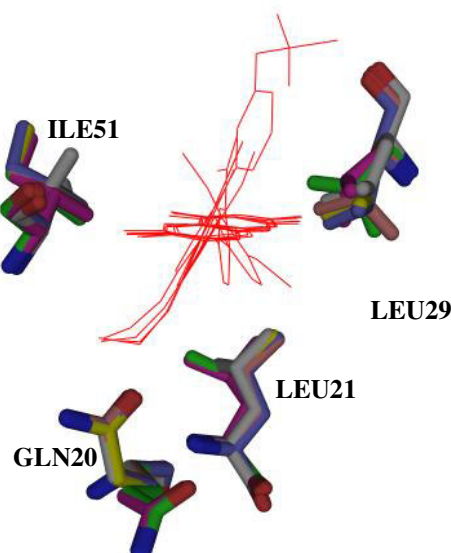
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Parte I – Docagem molecular

4.1.1. Análise dos aminoácidos flexíveis e do encaixe induzido

Após o alinhamento das seis estruturas cristalográficas da SaDHFR, a inspeção visual do sítio ativo revelou a presença de quatro aminoácidos flexíveis, isoleucina 51, glutamina 20, leucina 21 e leucina 29 (Figura 20).

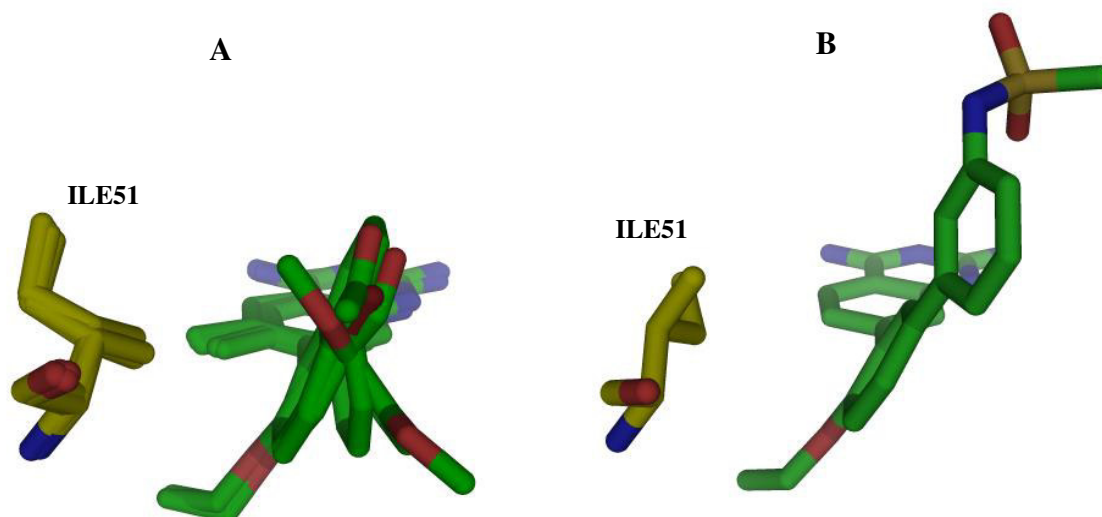
Figura 20. Aminoácidos flexíveis do sítio ativo da SaDHFR. Os ligantes estão representados por linhas vermelhas e os aminoácidos por bastões em diversas cores.



A analogia estrutural entre os ligantes co-cristalizados nas estruturas da SaDHFR permitiu a análise da relação entre as estruturas dos ligante e as mudanças conformacionais induzidas por estes no sítio ativo da SaDHFR.

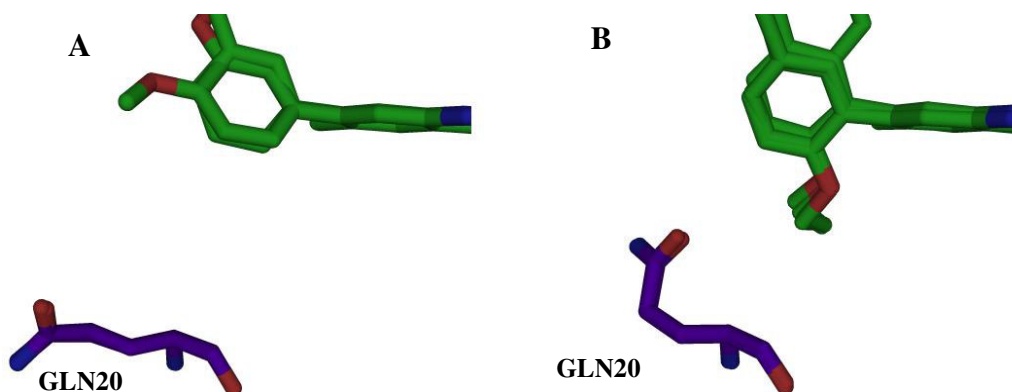
A presença de ligantes metilados no carbono 6 do anel quinazolínico induz uma mudança conformacional na isoleucina 51 do sítio ativo da SaDHFR, sendo essa mudança observada em todos os cinco complexos cristalográficos (3SR5, 3SRQ, 3SRR, 3SRS e 3SRW) contendo ligantes metilados na referida posição (Figura 21A). Na estrutura cristalográfica 3SRW, onde o ligante 26A não se encontra metilado na posição 6, observa-se que a isoleucina 51 assume uma conformação linear em relação ao plano do núcleo quinazolínico (Figura 21B).

Figura 21. Conformações da isoleucina 51 na presença de ligantes não substituídos na posição 6 do anel quinazolínico (**B**) e substituídos com uma metila (**A**). Os ligantes e a isoleucina 51 estão representados por bastões verdes e amarelos respectivamente. Os átomos de oxigênio estão representados em vermelho e os de nitrogênio em azul.



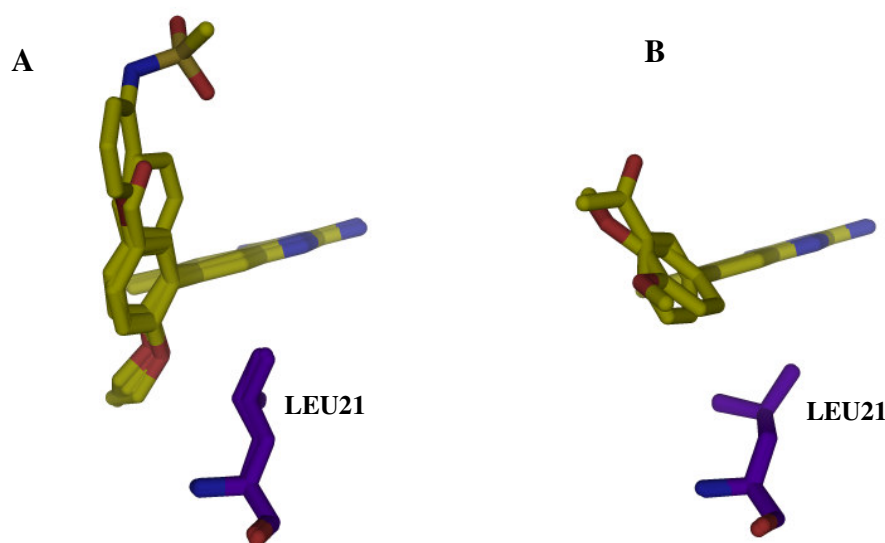
Nas estruturas cristalográficas 3SRR, 3SRS, 3SRU e 3SRW nota-se que a presença de ligantes com grupo etoxila na posição 2 da fenila funcionalizada no carbono 7 do anel quinazolínico, estabiliza a glutamina 20 em uma conformação direcionada para a cavidade catalítica (Figura 22B), enquanto que na ausência do referido grupo a glutamina 20 assume uma conformação mais linear, estendendo-se para o exterior da cavidade catalítica, como pode ser observado nas estruturas 3SR5 e 3SRQ (Figura 22A).

Figura 22. Conformações da glutamina 20 e dos respectivos ligantes. Conformações da glutamina 20 e dos ligantes 12A e 19B nas estruturas 3SR5 e 3SRQ (**A**) e dos ligantes 20B, 23B, 26A e 27A nas estruturas 3SRR, 3SRS, 3SRU e 3SRW respectivamente (**B**). As conformações dos ligantes e da glutamina 20 são representados por bastões verdes e púrpuras respectivamente.



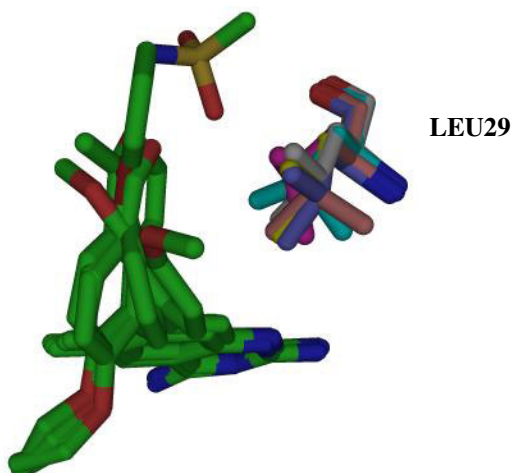
Um padrão conformacional análogo às mudanças da glutamina 20 foi observado na leucina 21, onde ligantes funcionalizados com a etoxila na posição 2, induzem uma mudança conformacional na leucina 21 para uma disposição espacial paralela à fenila dos ligantes (Figura 23A). Esse comportamento é notado nas estruturas 3SRR, 3SRS, 3SRU e 3SRW, que contém respectivamente os ligantes 20B, 23B, 26A e 27A. Nas estruturas 3SR5 e 3SRQ, que possuem como ligantes co-cristalizados 12A e 19B respectivamente, a leucina 21 assume uma conformação perpendicular ao plano do anel fenílico (Figura 23B).

Figura 23. Conformações da leucina 21 e dos respectivos ligantes em estruturas cristalográficas alinhadas. Conformações da leucina 21 e dos ligantes 20B, 23B, 26A e 27A e nas estruturas 3SRR, 3SRS, 3SRU e 3SRW (A) e dos ligantes 12A e 19B nas estruturas 3SR5 e 3SRQ respectivamente (B). A leucina 21 e os ligantes estão representados em púrpura e amarelo respectivamente.



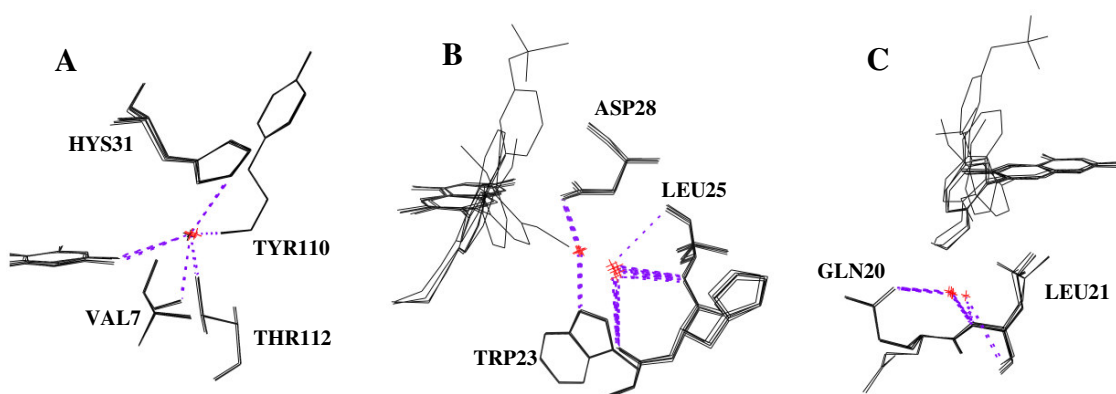
Não foi possível estabelecer padrões entre as estruturas moleculares dos ligantes e as conformações da leucina 29, provavelmente devido à alta flexibilidade observada nesse aminoácido que limita a inspeção visual como ferramenta para busca de relações estrutura/conformação (Figura 24).

Figura 24. Conformações da leucina 29 e dos ligantes 12A, 19B, 20B, 23B, 26A e 27A nas estruturas cristalográficas 3SR5, 3SRQ, 3SRR, 3SRS, 3SRU e 3SRW. Os ligantes estão representados por bastões verdes e a leucina 29 por bastões em cores diversas.



O alinhamento das estruturas tridimensionais da SaDHFR revelou também a presença de quatro grupos de moléculas de águas conservadas (Figura 25). O primeiro conjunto encontra-se interagindo por ligações de hidrogênio com o grupo 2-amino dos ligantes e com os aminoácidos valina 7, histidina 31, tirosina 110 e treonina 112 (Figura 25A). O segundo e o terceiro conjunto interagem com os aminoácidos aspartato 28, triptofano 23 e leucina 25 (Figura 25B).

Figura 25. Moléculas de água conservadas. Os aminoácidos e os ligantes estão representados por linhas pretas, as moléculas de água por asteriscos vermelhos e as ligações de hidrogênio por linhas tracejadas púrpuras.



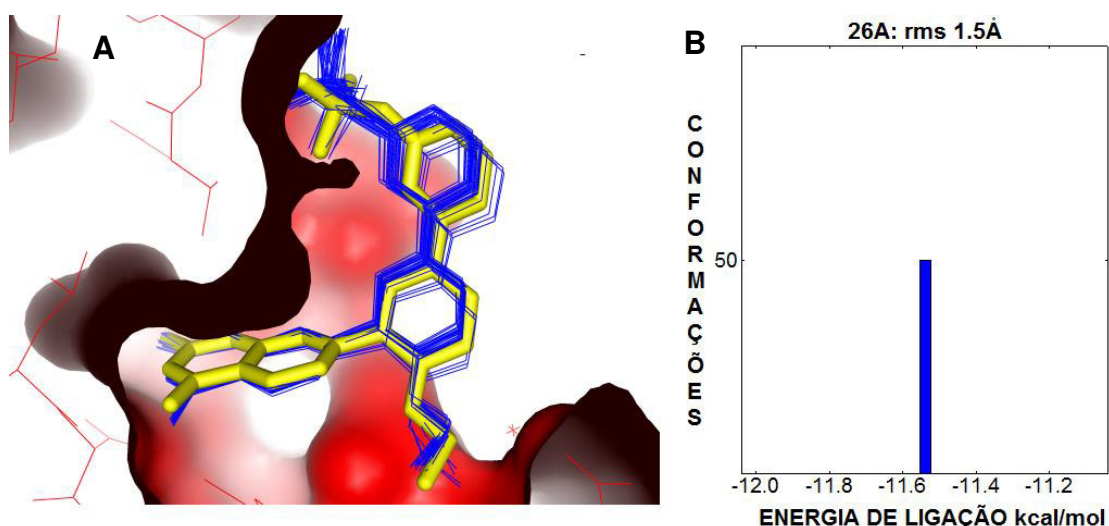
As ligações de hidrogênio com o quarto grupo de moléculas de água, ocorre com os aminoácidos glutamina 20 e leucina 21 (Figura 25C). As moléculas de água dos três primeiros grupos repetem-se em todas as cinco estruturas cristalográficas, enquanto que no quarto grupo a água da estrutura 3SRQ está

ausente, o embora visualmente não se observa um deslocamento dessa respectiva molécula de água pelo ligante.

4.1.2. Redocagem molecular

A simulação para recuperação da conformação experimental do ligante 26A no sítio ativo da SaDHFR demonstrou-se eficiente, como pode ser observada pela analogia conformacional entre as 50 poses e a conformação cristalográfica deste ligante (Figura 26A).

Figura 26. Redocagem do ligante 26A na estrutura cristalográfica da SaDHFR (PDB 3SRU). A – a conformação cristalográfica está esboçada por bastões amarelos e as conformações obtidas por simulação em linhas azuis, B – gráfico de agrupamentos das 50 simulações.



A análise do gráfico de agrupamentos (Figura 26B), revela a presença de apenas um *cluster* (para um rms de 1,5Å), indicando uma precisão no conjunto de soluções encontradas.

O RMSD calculado entre a pose de menor ΔG_{lig} e a conformação cristalográfica foi de 0,86 Å, um valor de acordo com dados da literatura para protocolos válidos^{117, 143, 145}.

Na redocagem, a maior sobreposição do anel quinazolinico entre as poses e a estrutura cristalográfica, indica uma menor flexibilidade dessa região da molécula, possivelmente devido ao menor volume da porção interna do sítio ativo

(Figura 26A), o que limitaria a dimensão do espaço conformacional, gerando soluções com elevada analogia conformacional.

As demais regiões do inibidor 26A (Figura 26A), apresentam um conjunto de soluções mais distintos da estrutura cristalográfica, possivelmente devido a maior acessibilidade ao solvente dessas regiões, tornando-a mais flexível.

4.1.3. Simulações de docagem molecular

Os valores energéticos apresentados correspondem à pose de menor ΔG_{lig} do *cluster* mais populoso. Quando o *cluster* mais populoso não apresentava a

Tabela 3 – Dados obtidos através da docagem molecular

Ligante	ΔG_{lig} (kcal/mol) ⁿ	$nC^{n}_{1.5}$	$nC^{n}_{0.5}$	ΔG_{lig} (kcal/mol) ^p	$nC^{p}_{1.5}$	$nC^{p}_{0.5}$	K_i (nM) ¹⁰¹
5A	-8,24	1	6	-8,84	1	3	9,10
6A	-8,37	1	2	-8,85	1	2	1,60
7B	-7,83	2	9	-8,82	2	7	2,70
8B	-8,04	1	4	-8,46	1	2	0,89
9A	-8,65	1	3	-9,11	1	2	5,0
10A	-8,97	1	2	-9,33	1	2	1,20
13A	-8,54	2	4	-9,44	1	4	0,66
14A	-8,54	1	1	-9,10	1	1	0,77
15A	-9,25	2	3	-9,49	2	4	0,19
16A	-9,23	2	4	-9,72	2	5	3,10
17A	-8,62	1	4	-9,21	1	3	0,13
18B	-9,09	1	4	-9,68	1	2	4,40
21A	-9,26	3	4	-9,94	2	5	0,38
22A	-9,34	2	5	-9,90	2	5	0,85
24B	-9,49	2	3	-9,97	2	6	0,61
25A	-9,58	4	8	-10,06	1	9	0,30
28A	-9,27	8	32	-9,86	6	21	0,025

n - valores obtidos para a espécie neutra.

p – valores obtidos para a espécie protonada.

nC – número de *cluster*.

1.5 ou 0.5 – valores de rms em Angstrom

pose de menor energia, a conformação escolhida fora aquela onde o anel diaminoquinazolínico encontrava-se em maior consonância com a estrutura cristalográfica do inibidor 26A.

O ligante 28A apresentou o maior número de *cluster*, o que já era esperado, pois o mesmo possui o maior número de ligações rotacionáveis dentro da série análoga.

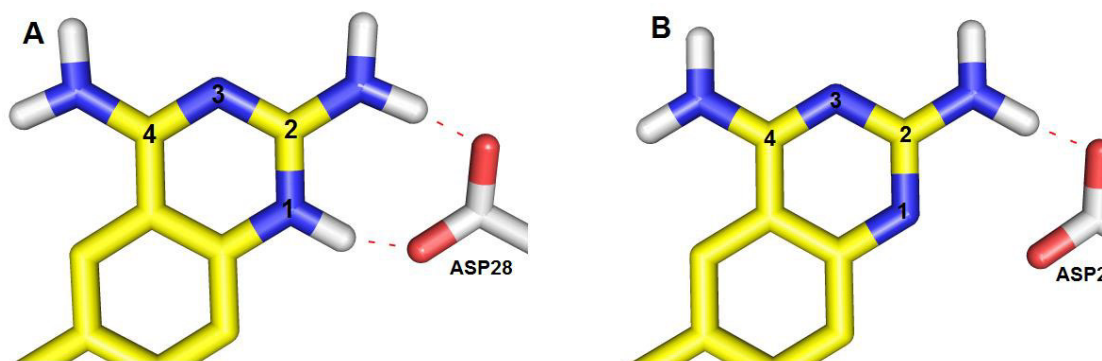
A análise do número de *cluster* tanto das espécies neutras como das protonadas considerando-se um rms de 1.5Å, revelou um baixo número de *cluster* para a maioria dos ligantes (Tabela 3).

Empregando-se um valor de rms mais exigente (0.5Å), observa-se que o número de *cluster* das espécies protonadas é inferior aos das espécies neutras (Tabela 4). Estes dados sugerem que a forma protonada dos ligantes, é melhor reconhecida pelo sítio ativo da SaDHFR.

Corroborando os dados de *cluster*, os valores dos ΔG_{lig} das espécies protonadas, revelaram uma maior afinidade pelo sítio ativo da forma protonada, visto que todos os ligantes protonados apresentaram valores de ΔG_{lig} inferiores aos valores obtidos para forma neutra (Tabela 3).

A maior afinidade da forma protonada pode ser justificada pela presença de uma ligação de hidrogênio extra, com forte natureza eletrostática que se forma entre o hidrogênio ácido do nitrogênio 1 e o carboxilato do aspartato 28 (Figura 27A).

Figura 27. Presença de uma ligação de hidrogênio extra com o aspartato 28 para os ligantes protonados (A) e ausência nos desprotonados (B). Os átomos de nitrogênio, oxigênio e hidrogênio estão representados em azul, vermelho e branco respectivamente.

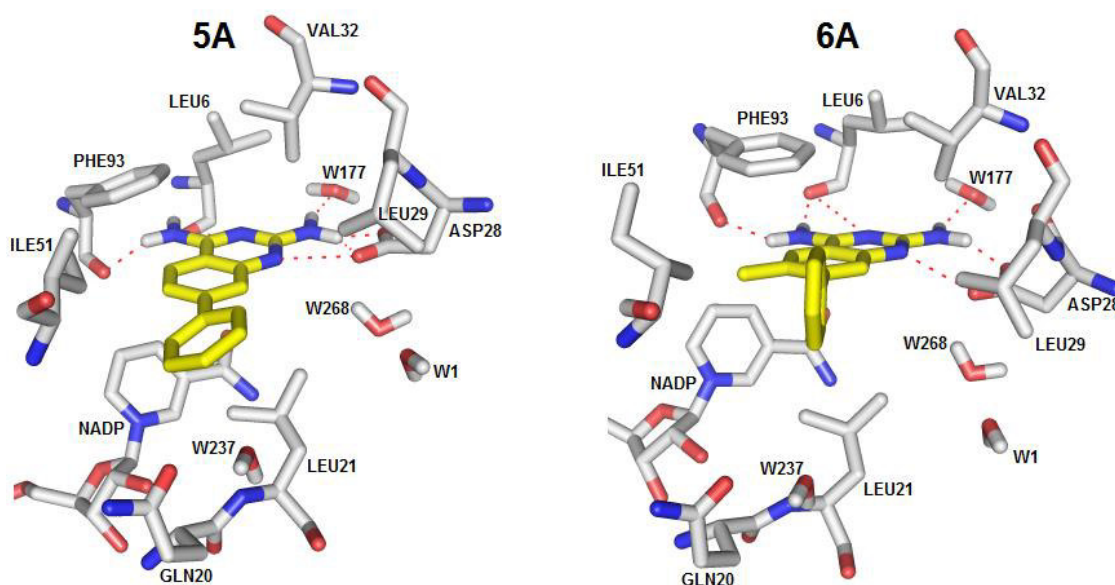


Um inibidor protonado e realizando uma ligação de hidrogênio análoga é reportada por Coco e colaboradores (1983), ocorrendo entre o anel pteridínico do trimetrexato e a DHFR (mamífera e bacteriana), empregando ressonância magnética nuclear²³¹. Bennette e colaboradores (2006), fazendo o uso da difração de nêutrons também relatam a presença da forma protonada do trimetrexato no interior da DHFR de *E. coli*²³².

Na análise dos resultados da docagem molecular as interações entre os ligantes 5A e 6A (Figura 28) e o sítio ativo da DHFR serão usadas como padrão para os estudos dos demais ligantes, devido a menor complexidade estrutural deles ou quando convenientemente comparados a outros compostos da série devido a uma maior similaridade estrutural.

As simulações de docagem molecular do ligante 5A indicaram a existência de ligações de hidrogênio entre os grupos 2,4-diamino do anel quinazolínico e as carbonilas dos aminoácidos fenilalanina 93, leucina 6, aspartato 28 e com a água conservada 177 (Figura 28). Observa-se também, uma interação polar entre o nitrogênio 1 do anel quinazolínico e o carboxilato do aspartato 28 (Figura 28).

Figura 28. Docagem molecular dos ligantes 5A e 6A, no sítio ativo da SaDHFR. Os ligantes estão representados por bastões amarelos. O cofator e os aminoácidos estão representados por bastões cinzas. Os átomos de nitrogênio estão esboçados em vermelho, os de nitrogênio em azul e os hidrogênios polares dos ligantes em cinza.



As interações entre os grupos 2,4-diamino do núcleo quinazolínico e a fenilalanina 93, leucina 6 e aspartato 28, estão presentes em complexos cristalográficos contendo 2,4-diaminoquinazolíνας complexadas a SaDHFR, bem como as ligações entre o grupo 2-amino com a água 177 e com o aspartato 28^{101, 233}.

Além das interações polares, a subestrutura quinazolina do ligante 5A interage com o sítio ativo da SaDHFR por meio de empilhamento π - π entre os anéis aromáticos quinazolínicos e a fenila da cadeia lateral da fenilalanina 93, estando os anéis aromáticos orientados em paralelo deslocado (Figura 28). Esse tipo de interação é observada em estruturas cristalográficas envolvendo quinazolíνας e a diidrofolato redutase^{101, 233}.

A porção restante do ligante 5A, a fenila do carbono 7, interage por meio de forças de van der Waals com as cadeias laterais dos aminoácidos isoleucina 51, leucina 21, leucina 29 e glutamina 20, além de possuir superfície acessível ao solvente (Figura 28).

As interações entre o ligante 6A e os aminoácidos do sítio ativo da SaDHFR demonstram-se análogas ao ligante 5A, exceto pela interação do nitrogênio 3 do anel diaminoquinazolínico com a carbonila da leucina 6. Esse padrão de interação entre o núcleo 2,4-diaminoquinazolínico dos ligantes 5A e 6A e os aminoácidos do sítio ativo, estende-se aos demais ligantes docados da série.

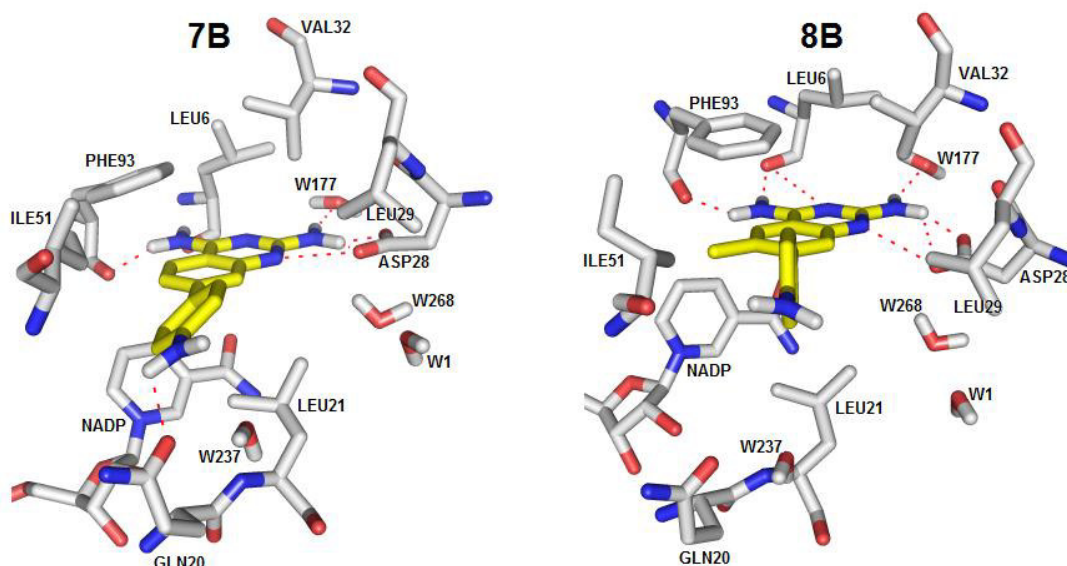
A presença da metila no carbono 6 no ligante 6A diminui o ΔG_{lig} deste em 0,13 kcal/mol, quando comparado ao ligante 5A, diminuição esta, em concordância o aumento da potência de 5,69 vezes observado no ligante 6A (Tabela 3). Contribuições para o abaixamento do ΔG_{lig} por interações de van der Waals entre metila do carbono 6 e a isoleucina 51, explicam as mudanças energéticas e de potência observadas com o ligante 6A (Figura 28).

As contribuições energéticas geradas pela interação entre a metila no carbono 6 e a isoleucina 51 também são observadas entre os ligantes 8B (Figura 29), onde tem-se uma diminuição de 0,21 Kcal/mol no ΔG_{lig} entre o ligante 8B e a SaDHFR, quando comparado ao análogo demetilado 7B (Tabela 3). Essa mudança energética corrobora com o aumento da potência de 3,03 vezes, observado no ligante 8B (Tabela 3).

O ligante 7B apresentou uma ligação de hidrogênio entre o grupo 4-amino da fenila do carbono 7 e a glutamina 20, interação esta, ausente no ligante 8B,

provavelmente devido ao deslocamento do mesmo, gerado pela presença da metila do carbono 6 (Figura 29).

Figura 29. Docagem molecular dos ligantes 7B e 8B, no sítio ativo da SaDHFR.



Uma interação entre um átomo polar funcionalizado na posição 4 é também observada no ligante 10A, onde tem-se a presença do grupo metilsulfona que forma uma ligação de hidrogênio através de seu átomo de oxigênio com a carbonila da isoleucina 51 (Figura 30). As contribuições da metila do carbono 6 também são observadas nesse par (9A e 10A) de análogos, diminuindo o ΔG_{lig} em 0,32 kcal/mol e aumentando a potência 4,17 vezes do metilado (Tabela 3).

Figura 30. Docagem molecular dos ligantes 9A e 10A, no sítio ativo da SaDHF

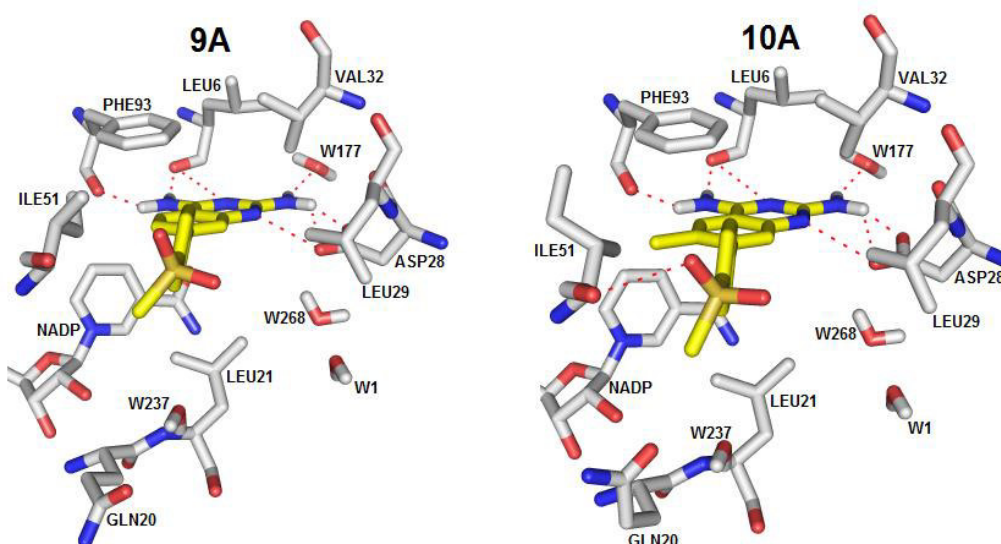
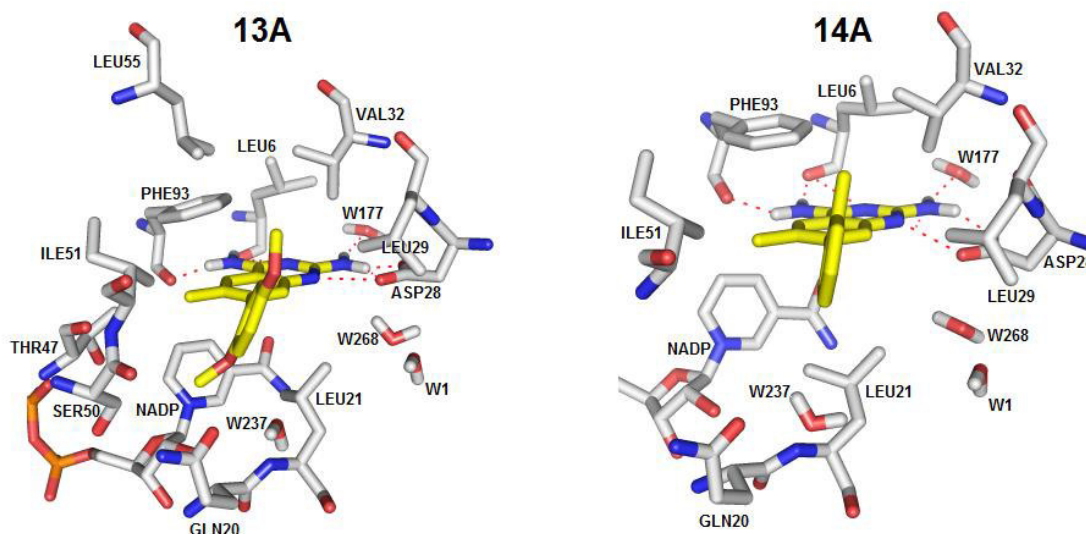


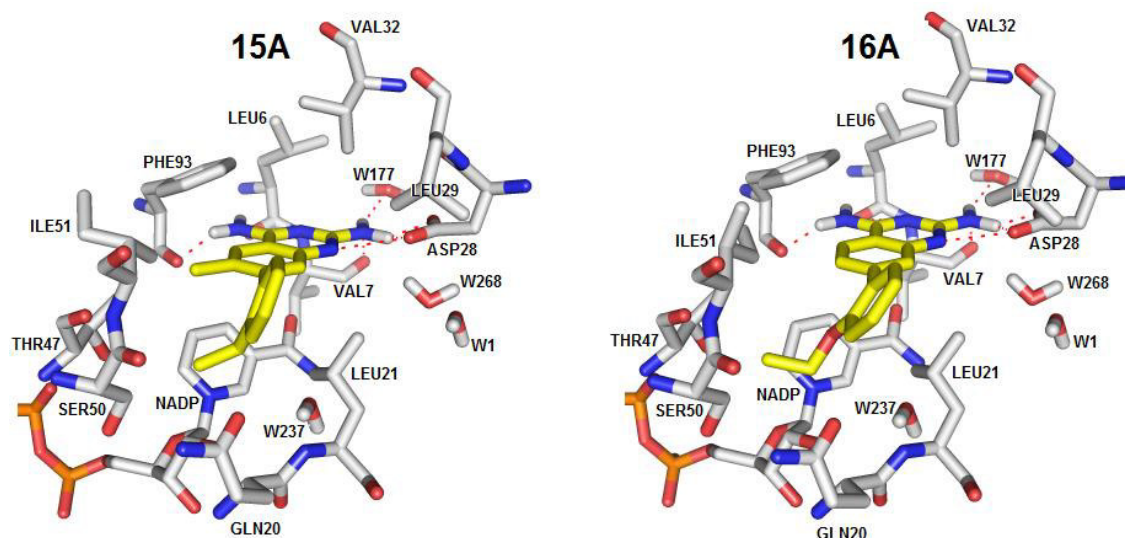
Figura 31. Docagem molecular dos ligantes 13A e 14A, no sítio ativo da SaDHFR.



A conformação do ligante 13A, sugere que o incremento de potência observado neste inibidor, deve-se a interações hidrofóbicas entre a cadeia lateral dos aminoácidos glutamina 20, serina 50, treonina 47, isoleucina 51, fenilalanina 93, leucina 55, valina 32, leucina 29 e leucina 21 com as metoxilas funcionalizadas nas posições 2' e 5' da fenila do carbono 7, além de interações entre a 5'-metoxila e a porção nicotinamida do NADP (Figura 31). O valor discretamente superior da constante de inibição do ligante 14A quando comparado ao 13A, pode ser atribuída a uma menor interação hidrofóbica entre a 2'-metila da fenila do carbono 7, que se dá apenas com a isoleucina 51, fenilalanina 93, valina 32 e leucina 29, diferentemente do ligante 13A que interage também com a serina 50, treonina 47, glutamina 20, leucina 21 e com o NADP (Figura 31).

A potência 8,4 vezes maior do ligante 15A quando comparado ao 6A, justifica-se pela presença de interações de van der Waals entre o grupo 2'-etil, funcionalizado na fenila do carbono 7 e os aminoácidos treonina 47, serina 50, glutamina 20, leucina 51, leucina 21 e o cofator NADP (Figura 32).

Figura 32. Docagem molecular dos ligantes 15A e 16A, no sítio ativo da SaDHFR.



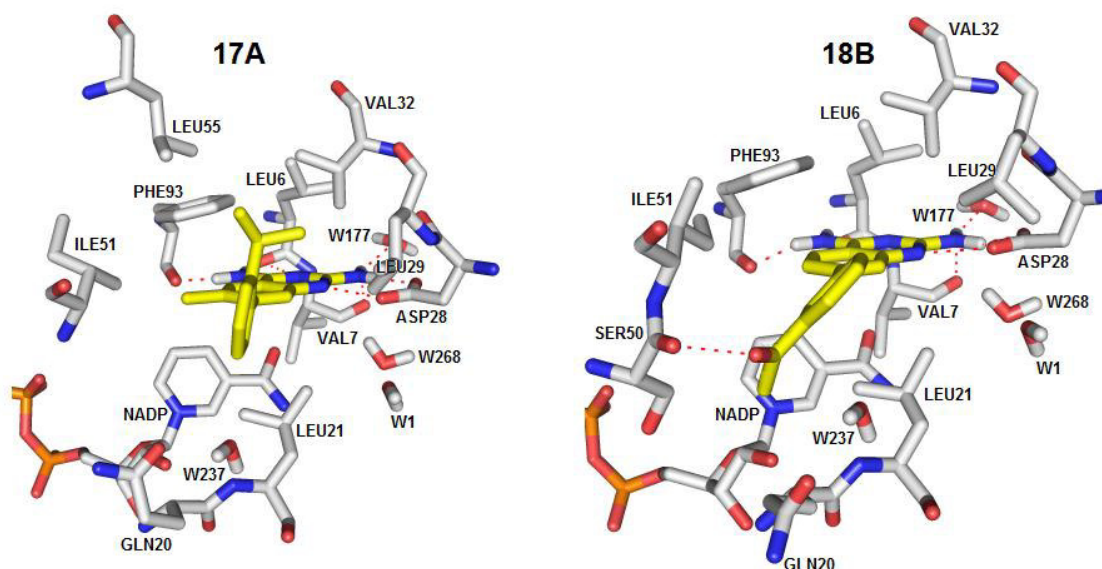
As simulações para o ligante 16A indicam que a introdução do substituinte 2'-etoxila na fenila do carbono 7 aumenta a afinidade deste ligante pelo sítio ativo devido a interações entre o referido grupo e a isoleucina 51, serina 50, leucina 21 e treonina 47, além de interações entre a porção nicotinamida do NADP, quando comparado ao ligante 5A (Figura 32).

A maior constante de inibição do ligante 16A quando comparado aos ligantes 13A, 14A e 15A (Tabela 3), pode ser explicada pela ausência da 6-metila e de grupos que possam interagir com os aminoácidos isoleucina 51, fenilalanina 93, leucina 55, valina 32 e leucina 29, confirmando desta forma a importância desses grupos para a atividade inibitória (Figuras 31 e 32).

A importância para a potência das interações hidrofóbicas está evidenciada no ligante 17A, onde a presença da 2'-isopropila na fenila do carbono 7 e da metila do carbono 6 do anel quinazolinico (Figura 33), aumentam a potência aproximadamente 24 vezes deste ligante em relação ao 16A e 70 vezes em relação ao ligante 5A (Tabela 3).

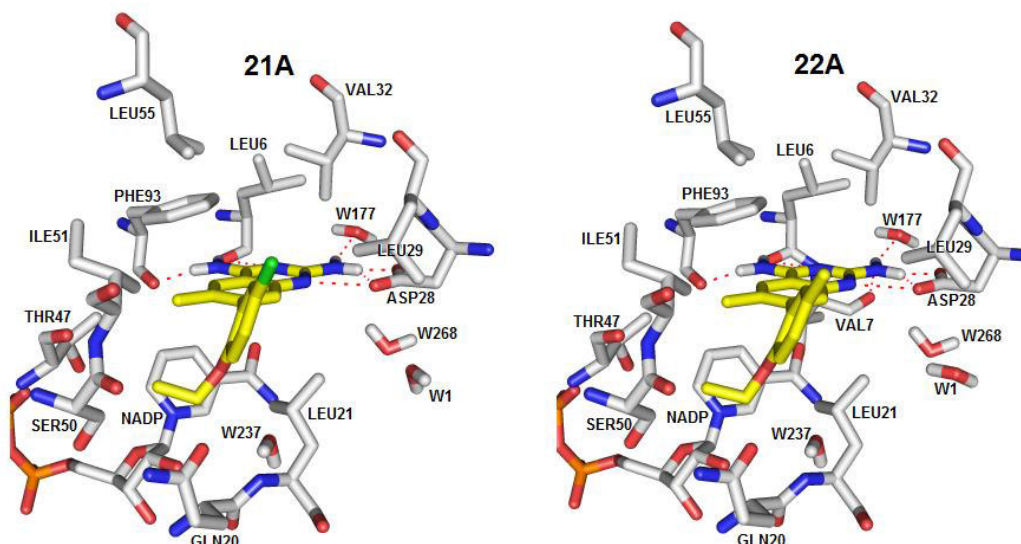
As contribuições hidrofóbicas também explicam a baixa potência do ligante 18B (Tabela 3), o qual é desprovido da metila do carbono 6 e de substituintes na posição 2' na fenila do carbono 7, restando apenas a 3'-etanona, a qual por meio do seu oxigênio carbonílico realiza uma ligação de hidrogênio com a serina 50 (Figura 33).

Figura 33. Docagem molecular dos ligantes 17A e 18B, no sítio ativo da SaDHFR.



A modelagem do ligante 21A no sítio ativo da SaDHFR demonstra uma alta analogia conformacional com o complexo formado pelo ligante 23B e a SaDHFR¹⁰¹. A conformação de ambos permite a interação entre a 2'-etoxila e os aminoácidos isoleucina 51, treonina 47, serina 50, glutamina 20 e leucina 21, além de interações com a porção nicotinamida do NADP (Figura 34). A analogia estende-se as interações entre o 3'-halogênio da fenila do carbono 7 (cloro no ligante 21A e bromo no 23B) e os aminoácidos isoleucina 51, leucina 55, fenilalanina 93, valina 32 e leucina 29 (Figura 34).

Figura 34. Docagem molecular dos ligantes 21A e 22A, no sítio ativo da SaDHFR.

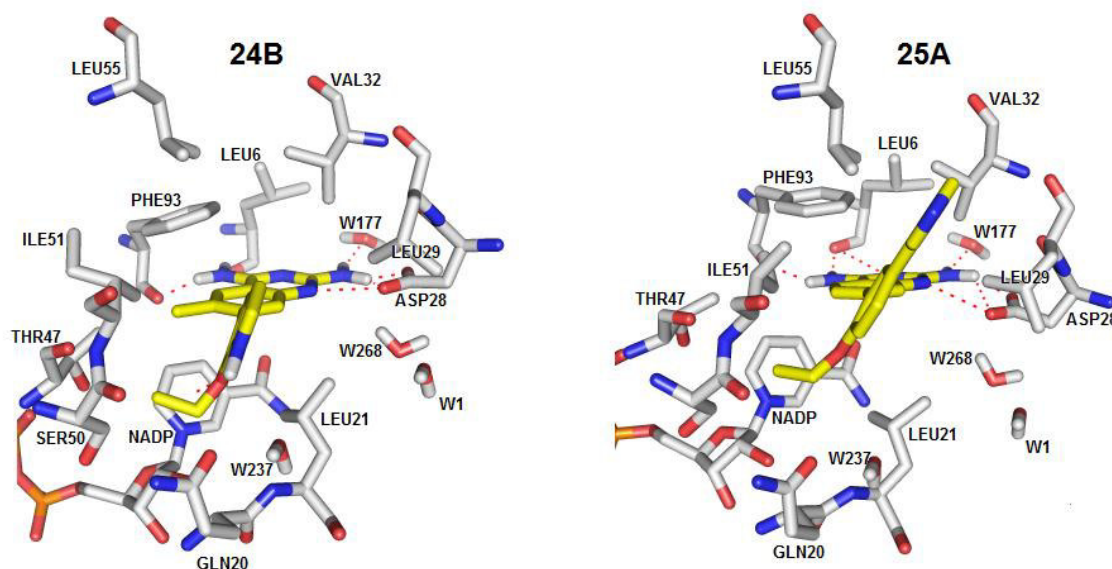


A docagem do ligante 22A demonstrou-se análoga ao 21A, diferindo apenas na interação do bolsão hidrofóbico formado pelos aminoácidos isoleucina 51, fenilalanina 93, leucina 55, valina 32 e leucina 29, com a 3'-metila funcionalizada no anel fenílico no carbono 7 (Figura 34). Esse padrão de interação encontra-se em concordância também com as obtidas por simulação, no ligante 16A (Figura 32) e nas estruturas cristalográficas contendo os ligantes 20B, 23B, 26A e 27A¹⁰¹.

O perfil de interação do ligante 24B com os aminoácidos do sítio ativo da SaDHFR exibiu similaridade com o modo de ligação do ligante 27A co-cristalizado com a SaDHFR (PDB 3SRW)¹⁰¹, estando o anel indólico do inibidor 24B em configuração espacial equivalente ao grupo naftil do ligante 27A (Figura 35).

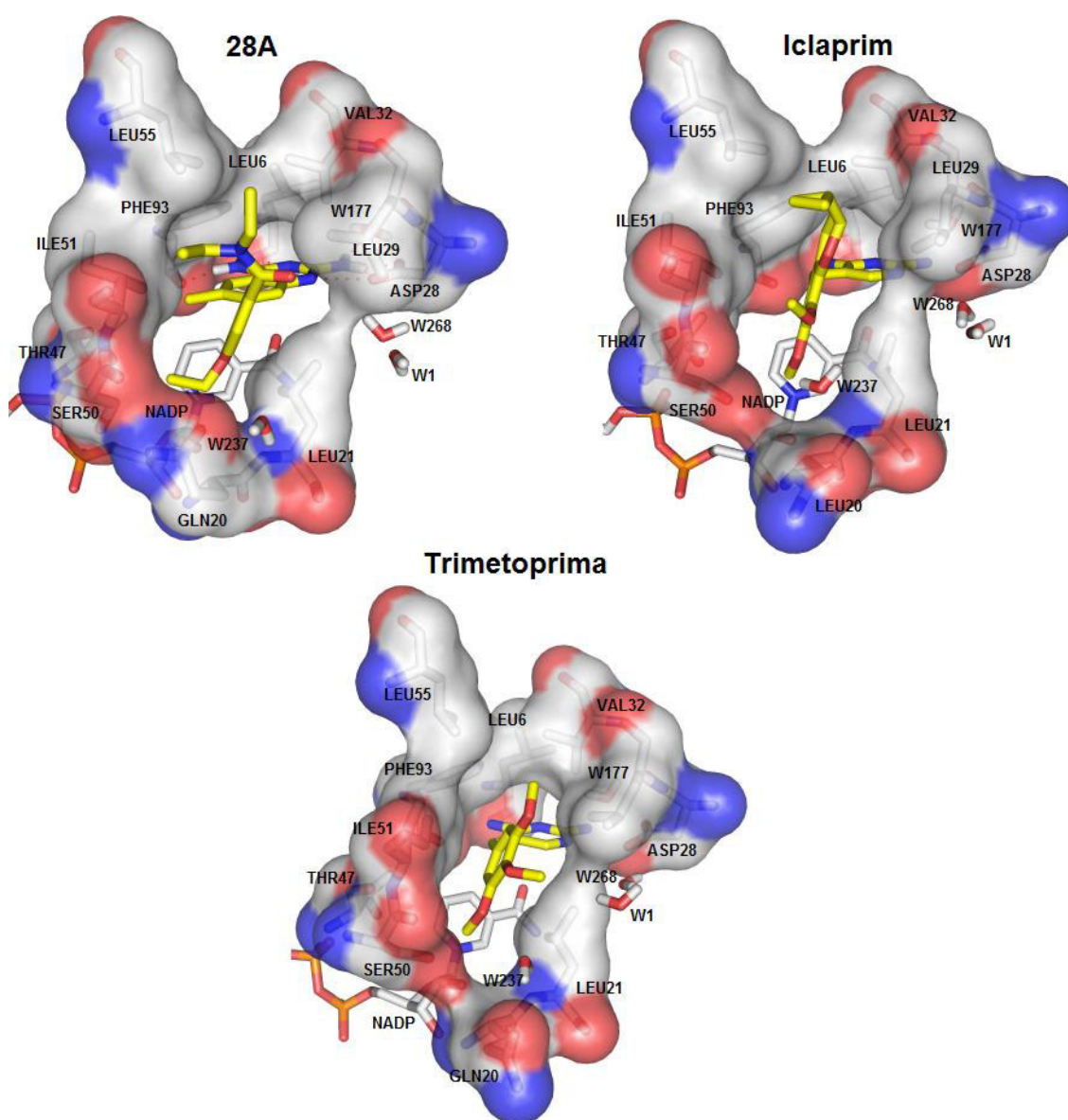
A análise da docagem molecular do inibidor 25A indicou um modo de interação semelhante à estrutura cristalográfica do complexo SaDHFR/26A (PDB 3SRU)¹⁰¹, onde a piridina encontra-se em uma disposição capaz de interagir principalmente por forças de van der Waals com os aminoácidos leucina 55, valina 32 e leucina 29 (Figura 35).

Figura 35. Docagem molecular dos ligantes 24B e 25A, no sítio ativo da SaDHFR.



As interações dos grupos 2-etoxil nos complexos formados pelos ligantes 16A, 21A, 22A, 24B, 25A e 28A (Figuras 31-35), do grupo 5'-metoxil no ligante 13A (Figura 31) e do grupo 2'-etil do ligante 15A (Figura 32), esboçam similaridade com os resultados experimentais das interações da 3'-metoxila do fármaco trimetoprima e da 7'-metoxila do anel cromeno do candidato à fármaco iclaprim (Figura 36)¹⁰³.

Figura 36. Docagem molecular do ligante 28A e estruturas cristalográfica dos complexos SaDHFR/Iclaprim (PDB 3FRF) e SaDHFR/Trimetoprima (PDB 3FRE). A superfície da SaDHFR está esboçada em vermelho e azul para a superfície próxima aos átomos de oxigênio e nitrogênio respectivamente. A superfície cinza indica regiões hidrofóbicas.



As interações hidrofóbicas com os aminoácidos isoleucina 51, fenilalanina 93, valina 32 e leucina 29, dos ligantes 13A, 14A, 17A, 21A, 22A, 24B, 25A e 28A (Figuras 31, 33, 34, 35 e 36) são apontadas também como responsáveis pela maior afinidade do iclaprim pela SaDHFR e consequentemente pela alta potência exibida por esse candidato frente ao *S. aureus*¹⁰³.

A docagem molecular do ligante 28A, o composto de maior potência e seletividade da série, indica que a maior afinidade frente a SaDHFR deve-se a maiores interações de van der Waals com a cavidade hidrofóbica formada pelos aminoácidos isoleucina 51, fenilalanina 93, leucina 55, leucina 6, valina 32 e leucina 29 (Figura 36). Esta região encontra-se preenchida pelo grupo N,N-dietilamida do ligante 28A, aumentando a complementariedade estereoquímica, com consequências positivas na atividade inibitória.

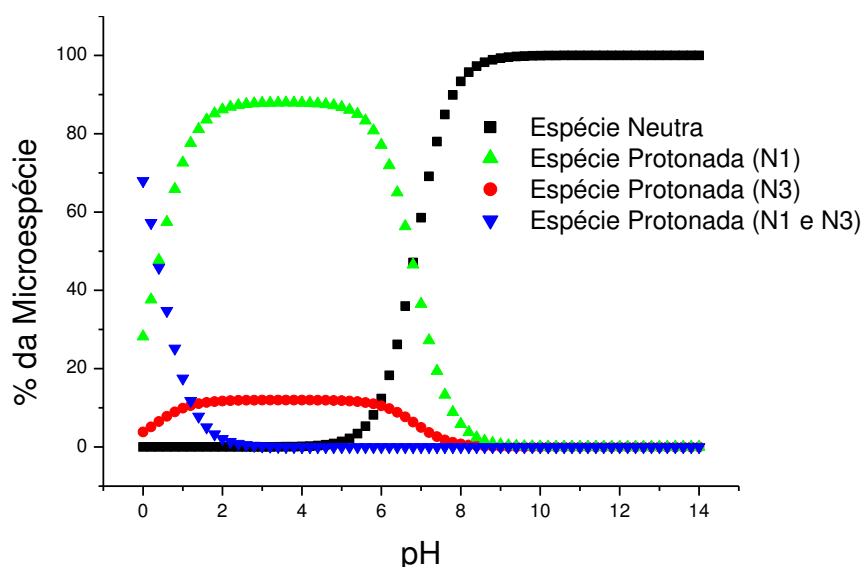
A interação com esta região hidrofóbica da porção ciclopropilpirano do iclaprim é também apontada como a responsável pela alta afinidade deste composto frente à SaDHFR¹⁰³. Observa-se que a trimetoprima, o inibidor com menor atividade frente à SaDHFR é desprovido de grupos volumosos que possam ocupar esta região hidrofóbica, o que explicaria a menor afinidade deste fármaco frente a SaDHFR (Figura 36).

4.2. PARTE II – QSAR

4.2.1. Análise titulométrica teórica

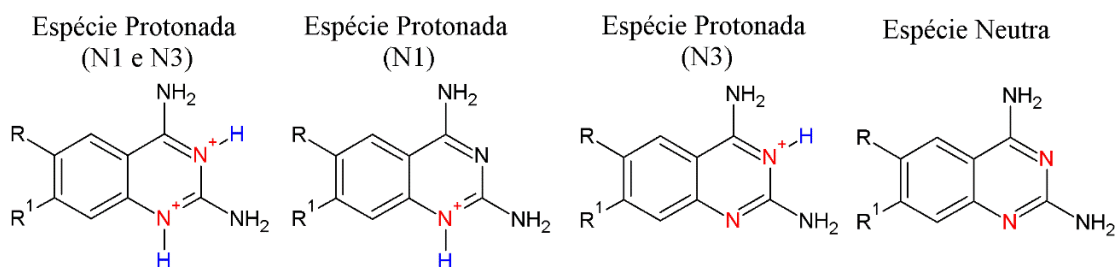
A análise titulométrica teórica revelou que na faixa de pH de 0 a 14, cada ligante encontra-se, pelo, menos sob a forma de quatro espécies (Figura 37). Uma espécie diprótica, uma neutra e duas monopróticas (Figura 38).

Figura 37. Abundância das espécies químicas coexistentes na faixa de pH de 0 a 14.



Em pH 7,4 (pH fisiológico)²³⁴ a espécie mais abundante é a neutra, que varia de 72,40 a 79,71% do total de espécies, seguida da espécie protonada em N1, que possui abundância entre 18,04 e 24,66%. Somadas, as duas espécies mais abundantes correspondem a mais de 90% das espécies totais em condições fisiológicas (Tabela 4).

Figura 38. Espécies químicas coexistentes na faixa de pH de 0 a 14. Os nitrogênios protonáveis estão em vermelho e os hidrogênios ácidos em azul.



A ausência de protonação nas aminas 2 e 4 (Figura 38) pode ser justificada por uma ressonância entre os pares de elétrons não-ligantes dessas aminas para

estabilizar as cargas positivas dos nitrogênios 1 e 3, diminuído desta forma a disponibilidade dos elétrons e consequentemente a capacidade de abstração de prótons por esses grupos.

Tabela 4 – Dados obtidos por meio da titulação teórica e descritores empregados na construção do modelo de QSAR.

Ligante	pK _a (N1)	%L ^N _{pH 7,4}	%L ^C _{pH 7,4}	pK _{aN1}	RM
5A	6,85	78,00	19,37	6,85	73,34
6A	6,98	72,40	24,34	6,98	78,16
7B	6,86	77,63	19,66	6,86	75,57
8B	6,99	71,99	24,66	6,99	82,4
9A	6,84	78,28	19,12	6,84	85,29
10A	6,97	72,72	24,06	6,97	89,91
11A	6,81	79,41	18,13	6,81	80,02
12A	6,98	72,43	24,31	6,98	91,52
13A	6,94	74,22	22,75	6,94	91,52
14A	6,98	72,46	24,29	6,98	82,99
15A	6,98	72,48	24,27	6,98	87,71
16A	6,81	79,41	18,13	6,81	84,65
17A	6,98	72,51	24,24	6,98	92,35
18B	6,85	78,07	19,30	6,85	83,37
19B	6,98	72,49	24,26	6,98	88,19
20B	6,94	74,10	22,86	6,94	96,23
21A	6,94	74,15	22,81	6,94	94,37
22A	6,95	73,92	23,01	6,95	94,3
23B	6,94	74,01	22,94	6,94	97,16
24B	6,93	74,65	22,37	6,93	101,75
25A	6,82	79,29	18,04	6,82	107,33
26A	6,81	79,07	17,99	6,81	124,64
27A	6,93	74,49	22,51	6,93	107,32
28A	6,94	74,11	22,84	6,94	117,12

%L^N_{pH 7,4} – percentual da microespécie neutra a pH 7,4 e 298 K

%L^C_{pH 7,4} – percentual da microespécie carregada a pH 7,4 e 298 K

pK_{aN1} – pKa do nitrogênio 1 e RM – refratividade molar

4.2.2. Modelo

O modelo desenvolvido neste trabalho que correlaciona os valores das constantes de inibição com as propriedades extraídas das estruturas químicas (Tabela 4), está apresentado na Equação 18.

$$\log\left(\frac{1}{K_i}\right) = -23,315001 + 2,753988 (pK_{a_{N1}}) + 0,048307(RM) \quad (18)$$

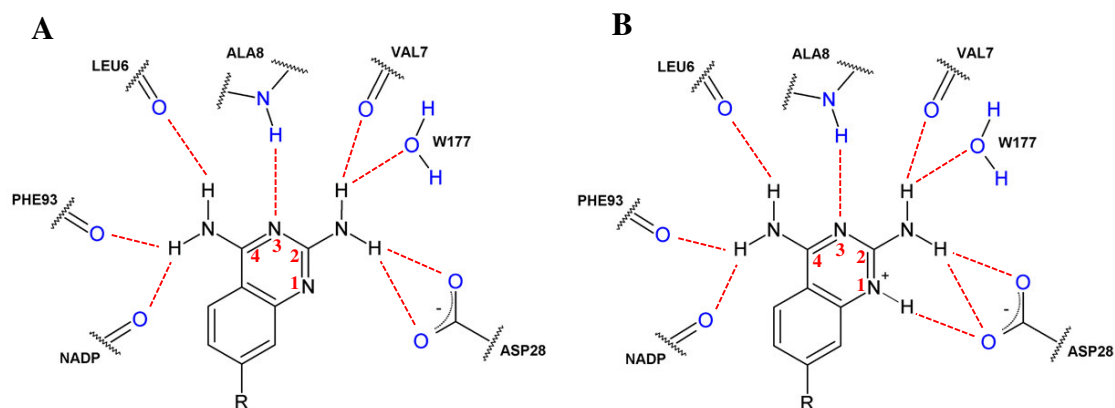
O presente modelo demonstra que a inibição da atividade enzimática da SaDHFR pela série análoga de diaminoquinazolinás, pode ser explicada pela combinação linear dos valores da refratividade molar (RM) e do pK_a do nitrogênio 1 ($pK_{a_{N1}}$) do anel quinazolinico (Equação 18). Os valores dos coeficientes das variáveis independentes demonstram uma maior contribuição para o modelo, do pK_a do nitrogênio 1, seguido da refratividade molar (Equação 18).

O sinal positivo do coeficiente para o pK_a no modelo, indica que um aumento deste, está relacionado a um incremento da potência (Equação 18). Essa contribuição positiva do pK_a do nitrogênio 1 sugere que a espécie protonada (Figura 39B) possui um maior papel na inibição enzimática já que, maiores valores de pK_a diminuem o número de espécies neutras e aumentam o de protonadas (Tabela 5).

A formação de uma ligação de hidrogênio extra entre o hidrogênio do nitrogênio 1 na espécie protonada e o carboxilato do aspartato 28 do sítio ativo (Figura 39B) corrobora com a contribuição do pK_a indicada no modelo de QSAR para a inibição da atividade enzimática (Equação 18).

A maior contribuição dessa ligação de hidrogênio frente as demais, pode ser justificada por uma maior força, gerada pelo nitrogênio carregado que remove densidade eletrônica do hidrogênio tornando-o mais positivo e favorecendo a interação com o carboxilato (Figura 39B). Essa justificativa indica que as espécies dos ligantes protonadas em N1, possuem uma maior afinidade pelo sítio ativo da enzima e um importante papel na inibição enzimática mesmo não estando em maior concentração.

Figura 39. Interações polares em 2D entre o núcleo 2,4-diaminoquinazolínico e o sítio ativo da SaDHFR.



A importância do pK_a para a atividade antimicrobiana é reportada por Schop e colaboradores (2000), que atribuíram a resistência parcial observada na *E. coli* frente a 2,4-diaminopirimidinas, às interações entre a carga do nitrogênio pirimidínico e os grupos fosfatos e carboxilatos da membrana²³⁵. Outro modelo desenvolvido por Girgis e colaboradores (2012) evidencia o papel do pK_a na atividade citotóxica de uma série de congêneres frente a linhagem celulares de hepatoma²³⁶.

De forma semelhante ao pK_a , a refratividade molar apresentou uma contribuição positiva para atividade inibitória dos ligantes (Equação 18). A refratividade molar pode ser definida como um descritor que correlaciona o volume molar e o índice de refração representando assim, o tamanho e a polarizabilidade de uma molécula²³⁷. É calculada através do índice de refração (n), da massa molecular (M) e da densidade do cristal (ρ) por meio da equação de Lorentz-Lorenz (Equação 19)²³⁸.

$$MR = \frac{(n^2 - 1)M}{(n^2 + 2)\rho} \quad (19)$$

A interpretação da refratividade molar como um descritor de dimensão molecular no presente modelo, justifica a sua contribuição positiva para a potência, pois o aumento da estrutura dos ligantes ocasiona uma maior complementariedade estereoquímica entre os ligantes e o sítio ativo da enzima, aumentando desta forma a afinidade e logo a atividade biológica.

Do ponto de vista da polarizabilidade molecular, o incremento positivo para a potência devido a refratividade molar dos ligantes, pode ser explicado, pois ligantes com maiores valores de refratividade molar estarão sujeitos a uma maior deformação da nuvem eletrônica pelo ambiente químico do sítio ativo, aumentando assim a força dos dipolos e conseqüentemente a complementariedade estereoquímica.

A importância da refratividade molar para a inibição da DHFR do *S. aureus* foi reportada por Harris e colaboradores (1992), onde a mesma demonstrou-se importante não só no modelo para SaDHFR como também para os modelos da *Escherichia coli*, *Streptococcus faecalis*, e a DHFR hepática bovina²³⁹.

Além dos trabalhos de Harris, outros autores têm reportado a refratividade molar como um importante descritor em modelos que correlacionam a atividade biológica com a estrutura química, sejam em ensaios celulares ou enzimáticos²³⁹⁻²⁴⁴. Verma e Hansh (2010) desenvolveram um modelo quantitativo para explicar a potência de uma série de taxanos contra uma linhagem celular de carcinoma do cólon humano, onde a refratividade molar demonstrou-se o descritor de maior importância para o modelo²⁴⁰.

4.2.3. Validação

O grau de ajuste do presente modelo foi avaliado por meio da análise de variância (ANOVA), como demonstra a Tabela 5.

Tabela 5 – Análise de variância para o modelo de inibição da SaDHFR

Fonte	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	
Regressão	2	7,0023	3,50115	$R^2 = 0,901$
Resíduo	14	0,7715	0,05511	$R^2_{adj} = 0,887$
Total	16	7,7738		$F = 63,54$
				$P > F 9,481 \cdot 10^{-8}$

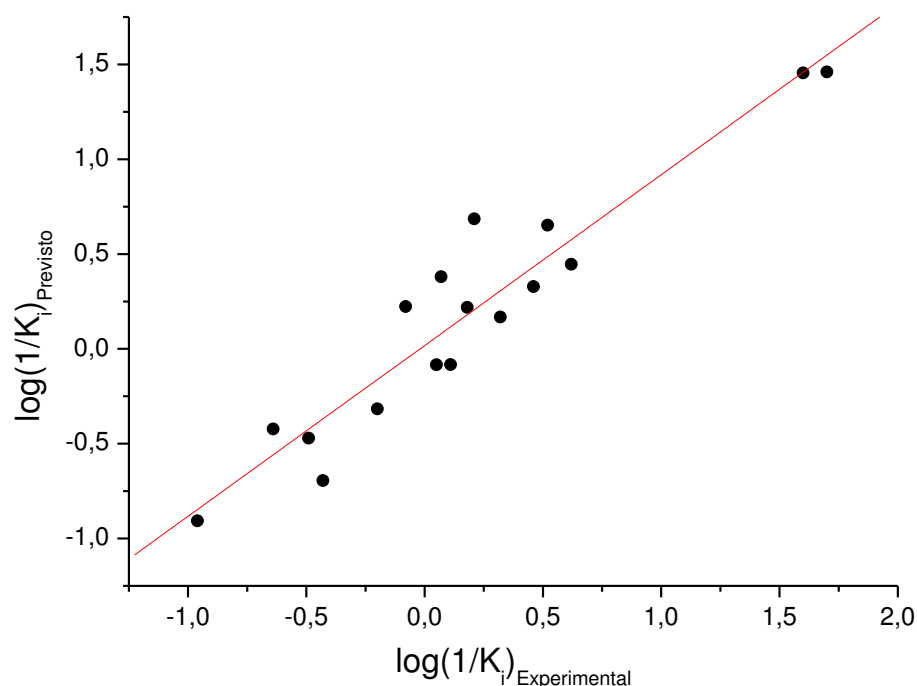
df – graus de liberdade (*degrees of freedom*)

SS – soma dos quadrados (*sum of squares*)

MS – média da soma dos quadrados (*mean squares*)

A análise da variância revelou que o presente modelo explica 90,1% da variação em torno da média por meio do coeficiente de determinação (R^2). Em concordância com o valor do R^2 , a correlação entre os valores previstos e os experimentais pode ser observada na Figura 40.

Figura 40. Valores previstos *versus* experimentais para a inibição da SaDHFR.



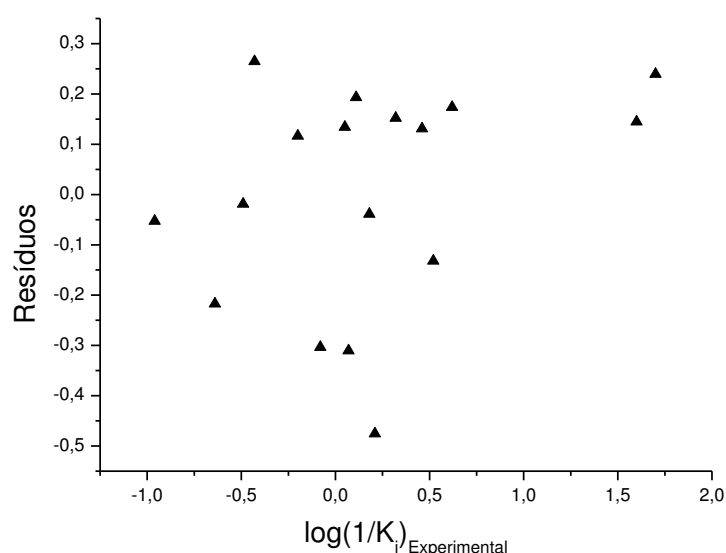
A confirmação da explicação pelo modelo, da maior parte da variabilidade dos dados, pode ser observada pelo baixo valor da soma dos quadrados dos resíduos, que é de 0,7715, quando comparado a soma dos quadrados da regressão, que é de 7,0023 (Tabela 5).

A validade do modelo com relação a capacidade de explicar a maior parte da variabilidade dos dados é confirmada pelo valor de F (Tabela 5), que é cerca de 14,01 vezes maior que o tabelado ($F_{2,4} = 3,74$) para os respectivos graus de liberdade, a uma confiança de 95%. Além dos valores do coeficiente de correlação e do F, o valor do **p** associado ao teste F é menor que 0,0001%, indicando uma baixa probabilidade de erro associada ao modelo.

A análise do coeficiente de determinação e do coeficiente de determinação ajustado indica um número adequado de descritores empregados na construção do modelo visto que, a diferença entre os dois é menor que 0,3²⁴⁵.

A avaliação da significância estatística do modelo pela análise dos resíduos e dos valores previstos da atividade biológica, não indicam a existência de erros sistemáticos no presente modelo, já que os pontos se distribuem de forma aleatória (Figura 41).

Figura 41. Valores previstos *versus* os experimentais para inibição da SaDHFR.



A significância estatística dos coeficientes da regressão linear foi avaliada com base em seus respectivos erros padrões, que são menores que os próprios valores dos coeficientes (Equação 20).

$$\log\left(\frac{1}{K_i}\right) = -23,315 (\pm 5,933162) + 2,753988(\pm 0,846210)pK_{a_{N1}} \quad (20)$$

$$+ 0,048307(\pm 0,004315)RM$$

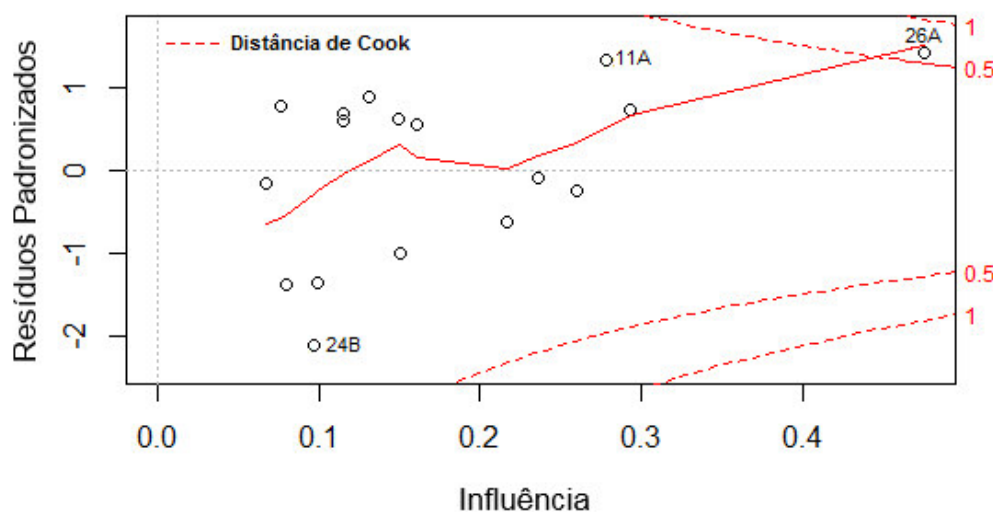
Para avaliar a existência de descritores com informação redundante no modelo, analisou-se a matriz de correlação dos descritores (Tabela 6). Os descritores pK_a e refratividade molar apresentaram a menor correlação uma baixa correlação (-0,18), indicando a inexistência de descritores redundantes no presente modelo.

Tabela 6 – Matriz de correlação entre os descritores

Fonte	pK_a	RM
pK_a	1	-0,18
RM	-0,18	1

A análise para detecção de *outliers* no modelo foi realizada por meio do gráfico de resíduos padronizados contra a influência de cada objeto no modelo (Figura 42). A posição dos pontos referentes a cada ligante revela a ausência de *outliers*, visto que nenhum ponto ultrapassa o valor de 1 para distância de Cook, a qual está representada por curvas tracejadas (Figura 42). Os pontos referentes aos ligantes 11A, 24B e 26A apresentaram-se como os objetos mais próximos da distância de Cook de 1, revelando-se como os objetos que mais influenciam o modelo quando removidos do mesmo (Figura 42).

Figura 42. Gráfico dos resíduos padronizados contra a influência de cada objeto no modelo. As distâncias de Cook de 0,5 e 1 estão representadas como curvas tracejadas.



A capacidade de previsibilidade do modelo foi testada inicialmente de forma interna, empregando-se a validação cruzada por LOO (do inglês, *leave-one-out*), a qual teve o coeficiente de correlação da validação cruzada (Q^2) determinado segunda a Equação 21. Nesta equação Y_{pred} e Y indicam respectivamente os valores preditos e observados das atividades, e \bar{Y} indica a média dos valores das atividades²⁴⁶. A validação cruzada apresentou um Q^2 igual a 0,90 indicando um modelo com previsibilidade interna adequada^{245, 246}.

O valor de Q^2 e R^2 , excluem a existência de superajuste, visto que a diferença entre os dois coeficientes é de 0,001, um valor menor que 0,3, condição esta para ausência do referido erro^{112, 245}.

$$Q^2 = 1 - \frac{\sum(Y_{pred} - Y)^2}{\sum(Y - \bar{Y})^2} \quad (21)$$

A preditividade foi avaliada também de forma externa por meio do R^2_{pred} (Equação 22), onde $Y_{pred(teste)}$ e Y_{teste} indicam os valores preditos e observados respectivamente, e \bar{Y}_{treino} a média das atividades do grupo treino²⁴⁶. O modelo apresentou R^2_{pred} igual a 0,65, um valor maior que 0,5, condição exigida para modelos de QSAR com adequado poder de predição externa²⁴⁶.

$$R_{pred}^2 = 1 - \frac{\sum (Y_{pred(teste)} - Y_{teste})^2}{\sum (Y_{(teste)} - \bar{Y}_{treino})^2} \quad (22)$$

4.3. PARTE III – PERFIL ADME/Tox

4.3.1. Perfil farmacocinético teórico

A análise farmacocinética teórica sugere que três compostos da série de diaminoquinazolina, são mais promissores, os quais apresentam-se biodisponíveis por via oral em humanos, sendo o composto 27A, o mais biodisponível, seguido pelos compostos 28A e 26A (Tabela 7).

Tabela 7 – Características farmacocinéticas e farmacodinâmicas

Ligante	HIA (%)	F (%)	PPB (%)	K _i (nM)	MIC (µg/mL)	MIC* (µg/mL)
26A	100	49,16	100	0,02	0,5	2
27A	100	99,99	100	0,026	0,125	0,5
28A	100	75,97	100	0,025	0,5	0,5
TMP	97 ²⁴⁷	>63 ⁹⁶	40 ⁹⁶	1,24 ¹⁰¹	1 ¹⁰¹	1 ¹⁰¹

HIA – absorção intestinal humana, **F** – biodisponibilidade oral humana, **PPB** – ligação às proteínas plasmáticas, **MIC**- concentração inibitória mínima, **MIC***- concentração inibitória mínima com 20% de soro, **TMP** – trimetoprima.

Corroborando os dados quantitativos de biodisponibilidade, as regras qualitativas de Lipinski e Veber indicam também um bom perfil farmacocinético, já que os três compostos satisfazem as mesmas (Tabela 8).

As menores biodisponibilidades observadas nos compostos 28A e 26A, podem ser justificadas devido a um maior metabolismo hepático, visto que todos os três compostos são bem absorvidos (Tabela 7).

A predição da ligação às proteínas plasmáticas indica que os três compostos se ligam fortemente às mesmas (Tabela 7). Essa alta ligação pode ser atribuída aos valores de logP superiores a 3 (Tabela 8), indicando uma forte contribuição

do efeito hidrofóbico. Essa contribuição é menos evidente no trimetoprima, que possui um logP menor que 3 e consequentemente uma baixa ligação às proteínas plasmáticas, quando comparado aos três compostos.

Tabela 8 – Características moleculares

Ligante	Lipinski				Veber			
	DH	AH	logP	MM	nRot	TPSA	logD _{7,4}	logS _{7,4}
26A	5	8	3,59	449,5	6	133,23	2,91	-7,44
27A	4	5	4,60	344,4	3	87,06	4,39	-7,64
28A	4	7	3,26	393,5	7	107,37	3,41	-6,62
TMP	4	7	0,91*	290,3	5	105,53	1,10	-2,45

DH – número de doadores de hidrogênio, **AH** – aceptor de hidrogênio, **logP** – logaritmo do coeficiente de partição octanol-água, **MM** – massa molecular, **nRot** – número de ligações rotacionáveis, **TPSA** – área superficial polar 2D, **logD_{7,4}** – logaritmo do coeficiente de partição octanol-tampão pH 7,4, **logS_{7,4}** – logaritmo da solubilidade a pH 7,4, **TMP** – trimetoprima, *(www.drugbank.ca).





















O aumento nos valores dos MICs dos compostos 26A e 27A, obtidos em meio contendo 20% de soro, foi atribuído por Li e colaboradores à ligação desses compostos aos constituintes do soro¹⁰¹. Os valores de logP e logS, corroboram com essas observações, visto que esses dois compostos se demonstraram mais lipofílicos e menos solúveis que o análogo 28A, o qual não apresentou mudanças em seu valor de MIC na presença de soro (Tabela 7).

O modelo empregado para determinação da ligação às proteínas plasmáticas não conseguiu distinguir os três compostos, pois a todos foi atribuído ligação máxima às proteínas (Tabela 7). Essa limitação, pode estar relacionada a imprecisão do modelo em distinguir valores de ligação às proteínas plasmáticas entre compostos de maior caráter lipofílico.

4.3.2. Perfil toxicológico teórico

Para avaliar o desempenho do *OSIRIS Property Explorer* e ter diferentes padrões de toxicidade para efeito comparativo, submeteu-se à análise um fármaco (trimetoprima), como composto de baixa toxicidade e o benzeno como composto químico de alta toxicidade. O programa identificou ausência dos quatro riscos para o fármaco trimetoprima e a presença dos quatro riscos para o benzeno (Tabela 9), demonstrando-se desta forma, capaz de distinguir um composto de alta toxicidade, de um de baixa toxicidade.

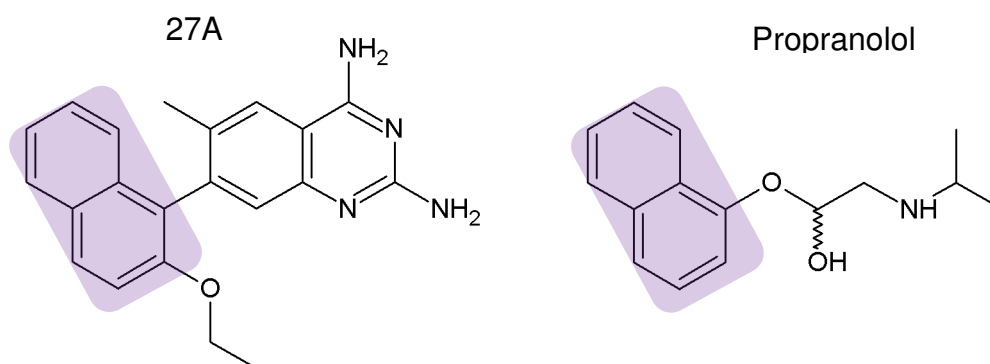
Tabela 9 – Riscos toxicológicos teóricos

Ligante	Mutagenicidade	Tumorigenicidade	Efeitos irritantes	Efeitos reprodutivos
26A				
27A				
28A				
TMP				
BZN				

Verde - Ausência do risco, Amarelo – risco médio, Vermelho – alto risco. TMP – trimetoprima, BZN – benzeno.

A análise toxicológica teórica revelou que os ligantes 26A e 28A, não possuem fragmentos moleculares responsáveis por efeitos mutagênicos, tumorigênicos, irritantes e reprodutivos (Tabela 9), demonstrando-se compostos promissores para as próximas etapas do processo de desenvolvimento. Apenas o ligante 27A apresentou um risco toxicológico potencial de mutagenicidade, porém de grau moderado (Tabela 9).

O algoritmo do *OSIRIS Property Explorer* indicou que o fragmento responsável pela mutagenicidade do ligante 27A é a subestrutura naftaleno (Figura 43). Apesar disso, esta subestrutura é encontrada na estrutura do antagonista beta-adrenérgico propranolol (Figura 43), um fármaco aprovado e em uso clínico⁹⁶. Assim, estudos *in vitro* e *in vivo* devem ser conduzidos para excluir ou não efeitos mutagênicos do ligante 27A.

Figura 43. Fórmulas estruturais do ligante 27A e do propranolol

Anterior à análise dos inibidores mais promissores, o modelo preditivo para o bloqueio do canal hERG, foi avaliado através da análise de um fármaco isento de cardiotoxicidade (trimetoprima) e de outro sabidamente cardiotoxíco, (cisaprida).

Tanto o modelo binário quanto o multiclasse indicaram ausência de inibição do canal hERG para o fármaco trimetoprima, com uma probabilidade de 79% para o modelo multiclasse e 85% para o binário (Tabela 10). A análise do fármaco cisaprida indicou que este composto inibe o canal hERG com uma probabilidade de 75% para o modelo multiclasse e 89% para o binário (Tabela 10), desta forma o modelo Pred-hERG demonstrou-se capaz de classificar tanto um inibidor quanto um não-inibidor, frente o canal hERG.

Tabela 10 – Probabilidade de inibição do canal hERG

Ligante	Modelo Binário	Modelo Multiclasse
26A	Bloqueador (69%)	Fraco/Moderado (48%)
27A	Bloqueador (61%)	Não-bloqueador (44%)
28A	Bloqueador (56%)	Não-bloqueador (48%)
TMP	Não-bloqueador (85%)	Não-bloqueador (79%)
CPD	Bloqueador (89%)	Bloqueador Forte (75%)

TMP – trimetoprima, CPD – cisaprida.

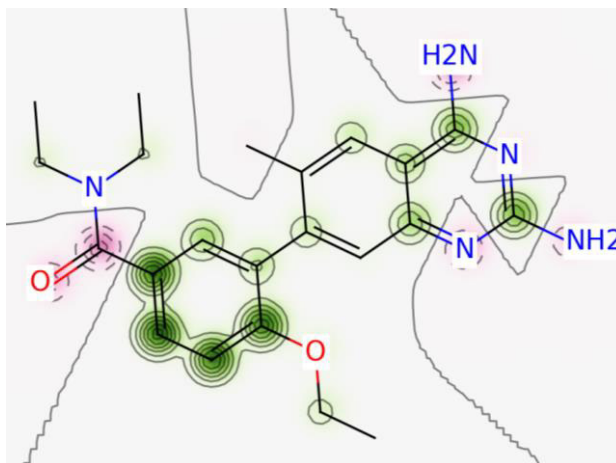
Dentre as três diaminoquinazolininas mais promissoras analisadas, a 26A apresentou o maior potencial de inibição do canal hERG, com uma probabilidade de bloqueio de 69% para o modelo binário e 48% para o multiclasse, sendo

classificado por este último como um inibidor fraco a moderado (Tabela 10). O composto 27A demonstrou uma probabilidade intermediária para o bloqueio do canal hERG, sendo classificado como bloqueador, de acordo com o modelo binário e não bloqueador pelo modelo multiclasse (Tabela 10).

A diaminoquinazolina 28A apresentou a menor probabilidade de bloqueio do canal hERG frente ao modelo binário (Tabela 10), sendo classificado como bloqueador, porém com uma probabilidade de 56%, além de possuir uma probabilidade de 48% frente ao modelo multiclasse, sendo classificado por este como não-bloqueador (Tabela 10).

Por ser o inibidor mais potente e seletivo da série, o ligante 28A teve seu mapa de probabilidade analisado, o que revelou uma maior presença de linhas de contorno verdes sob os átomos de carbono da 7-fenila (Figura 44), indicando uma maior contribuição desta região da molécula para o bloqueio do canal hERG.

Figura 44 – Mapa de probabilidade para bloqueio do canal hERG do inibidor 28A. Linhas de contorno verdes indicam contribuição positiva para a inibição e linhas rosas indicam contribuição negativa.



A análise dos dados indica que as diaminoquinazolinas 26A e 27A apresentam um maior potencial de cardiotoxicidade relacionada à inibição do canal hERG.

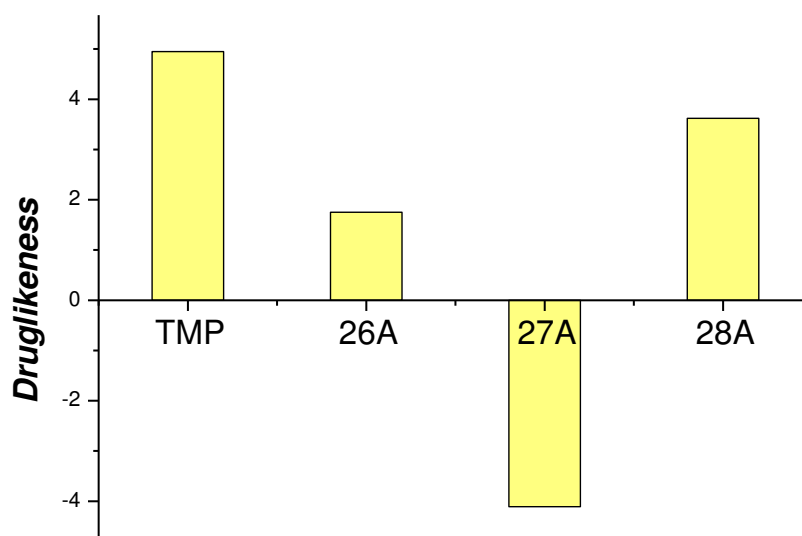
O inibidor 28A demonstra-se o mais promissor para seguir no processo de otimização, por apresentar o melhor perfil de segurança cardíaca teórico,

embora seu potencial cardiotoxico seja maior que o trimetoprima (Tabela 10). Com o auxílio do mapa de probabilidade, modificações estruturais racionais poderão ser realizadas para remover esse potencial e análogos com propriedades superiores poderão ser planejados.

4.3.3. Análise de similaridade

A análise da similaridade estrutural à fármacos, empregando o índice *Druglikeness*, disponível no *OSIRIS Property Explorer* indicou que as três diaminoquinazolinás mais promissoras, possuem distintas similaridades estruturais a fármacos (Figura 45).

Figura 45 – Índice *Druglikeness* dos inibidores 26A, 27A, 28A e do fármaco trimetoprima (TMP).

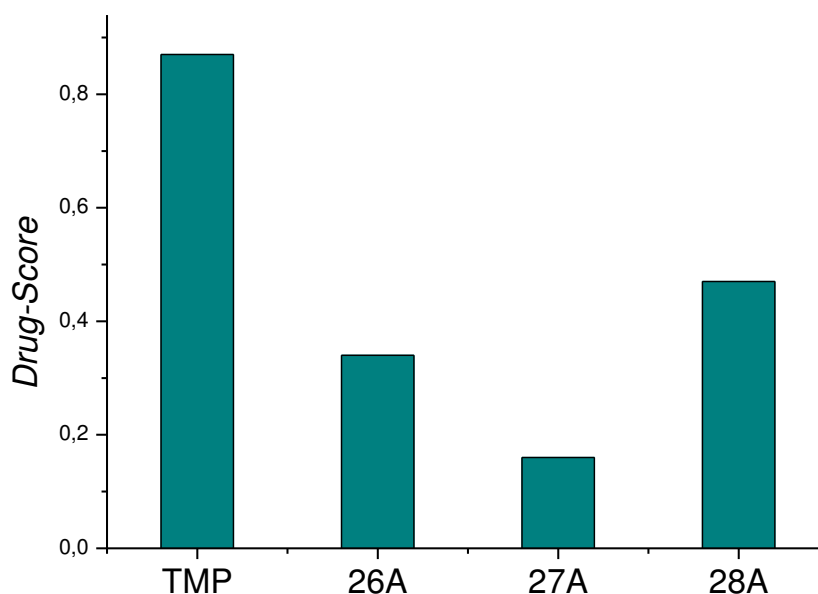


O inibidor 27A apresentou o menor valor de similaridade estrutural, sendo também o único composto a apresentar um valor negativo de *Druglikeness* (Figura 45). Esse baixo valor sugere que modificações estruturais mais radicais seriam necessárias para torna-lo mais estruturalmente relacionado à fármacos. O que poderia aumentar a probabilidade de efeitos negativos nas propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas dos análogos propostos.

O inibidor 26A diferentemente do 27A, exibiu um valor positivo do índice *Druglikeness* porém, baixo quando comparado ao do fármaco trimetoprima (Figura 45). O composto 28A demonstrou-se o inibidor mais promissor dentre as três diaminoquinazolinias, por apresentar o maior valor de *Druglikeness*, além de exibir um valor próximo ao do trimetoprima (Figura 45). Desta forma, discretas modificações estruturais são necessárias a fim de tornar o composto 28A mais próximo estruturalmente a fármacos

O perfil dos inibidores 26A, 27A, 28A e do fármaco trimetoprima frente ao índice *Drug-Score*, demonstrou-se análogo ao observado no *Druglikeness* (Figura 46), onde tem-se o inibidor 27A como o composto de menor valor de similaridade, seguido pelos compostos 26A, 28A e por último o fármaco trimetoprima (Figura 46).

Figura 46 – Índice *Drug-Score* dos inibidores 26A, 27A, 28A e do fármaco trimetoprima (TMP).



Apesar da analogia do índice *Druglikeness* com o *Drug-Score*, observa-se que as três diaminoquinazolinias apresentam valores de *Drug-Score* mais inferiores ao trimetoprima (Figuras 45 e 46). Esse comportamento pode ser justificado devido as baixas solubilidades das três diaminoquinazolinias quando comparadas ao trimetoprima, um composto com maior solubilidade (Tabela 8).

Solubilidades estas que diferem de 4 a 5 unidades logarítmicas da solubilidade do trimetoprima (Tabela 8).

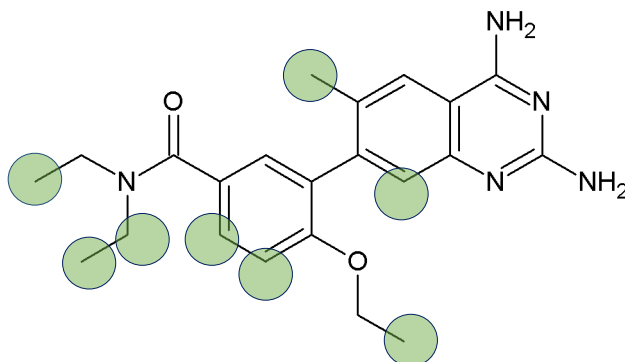
4.5. PARTE IV – Proposição de novos compostos

4.5.1. Modificações estruturais

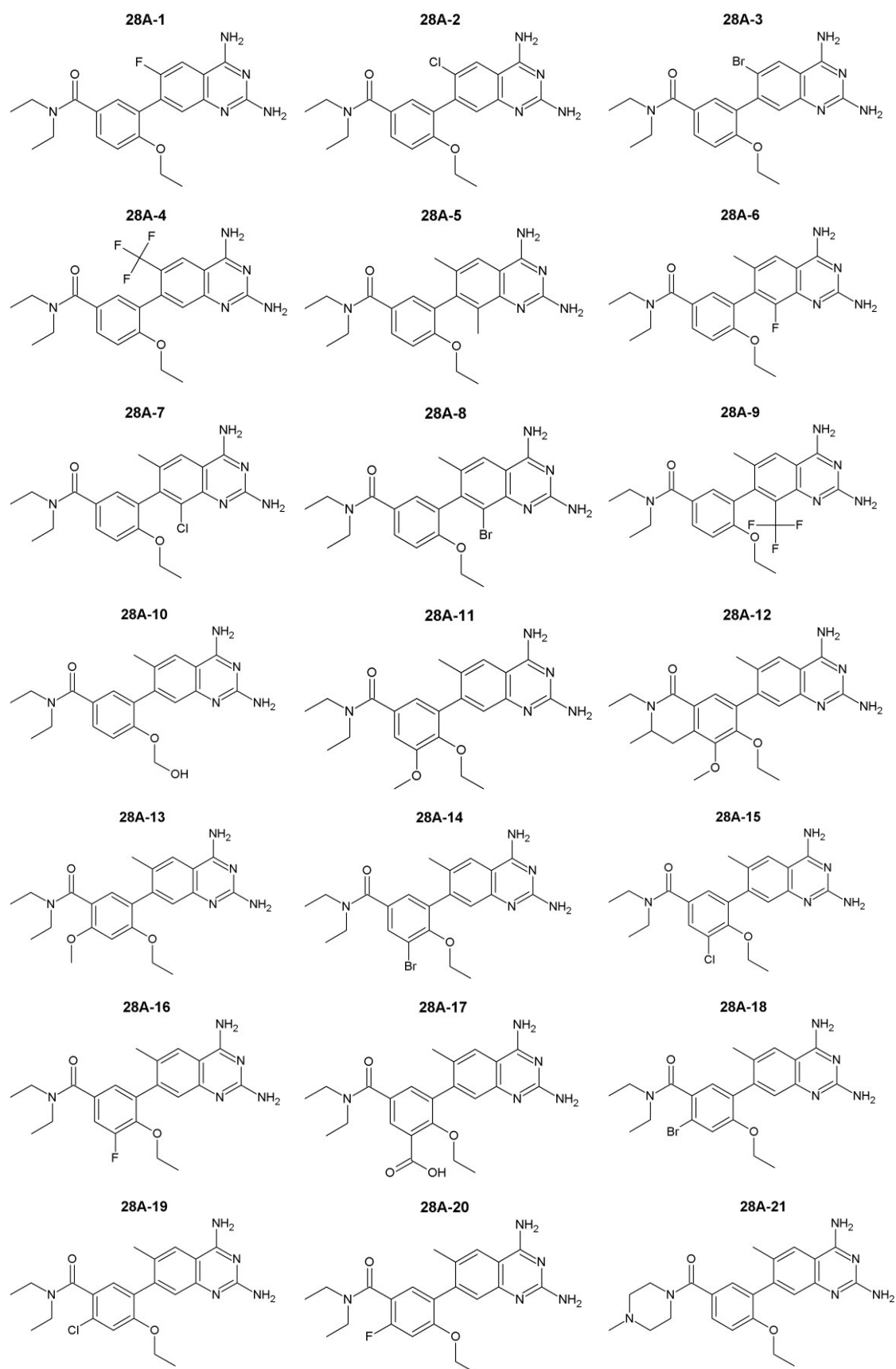
Dentre as três diaminoquinazolininas com melhores potências e seletividades, a 28A demonstrou-se a mais promissora, por apresentar um melhor perfil ADME/Tox e de semelhança a fármacos. Sendo assim, escolhida para modificações estruturais.

As regiões escolhidas no inibidor 28A para modificações estruturais estão esboçadas na Figura 47.

Figura 47 – Regiões de modificações estruturais no inibidor 28A. Os círculos verdes indicam as regiões da molécula que sofreram modificações.



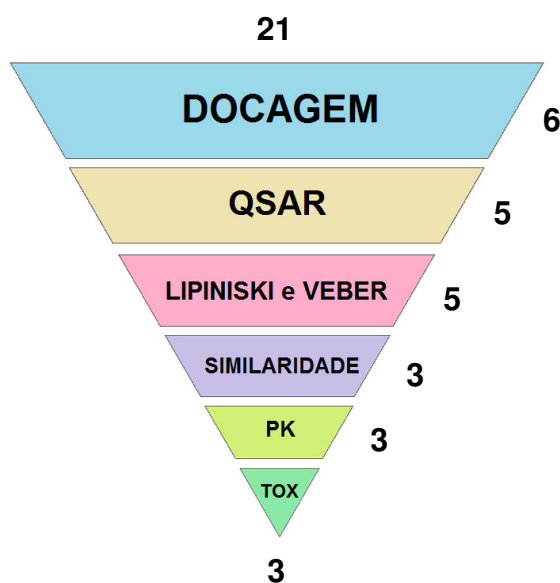
As modificações estruturais usadas geraram um conjunto de 21 novos ligantes (Figura 48).

Figura 48 – Série análoga proposta.

4.5.2. Análise dos análogos propostos

No primeiro filtro da triagem (docagem), 15 dos 21 análogos foram rejeitados (Figura 49), devido a valores ΔG_{lig} maiores que o observado para o ligante 28A (compostos 28A-1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 15, 16, 17, 19, 20). O uso do modelo de QSAR na próxima etapa removeu 1 (composto 28A-7) dos 6 compostos provenientes da docagem (Figura 49).

Figura 49 – Triagem dos análogos propostos.



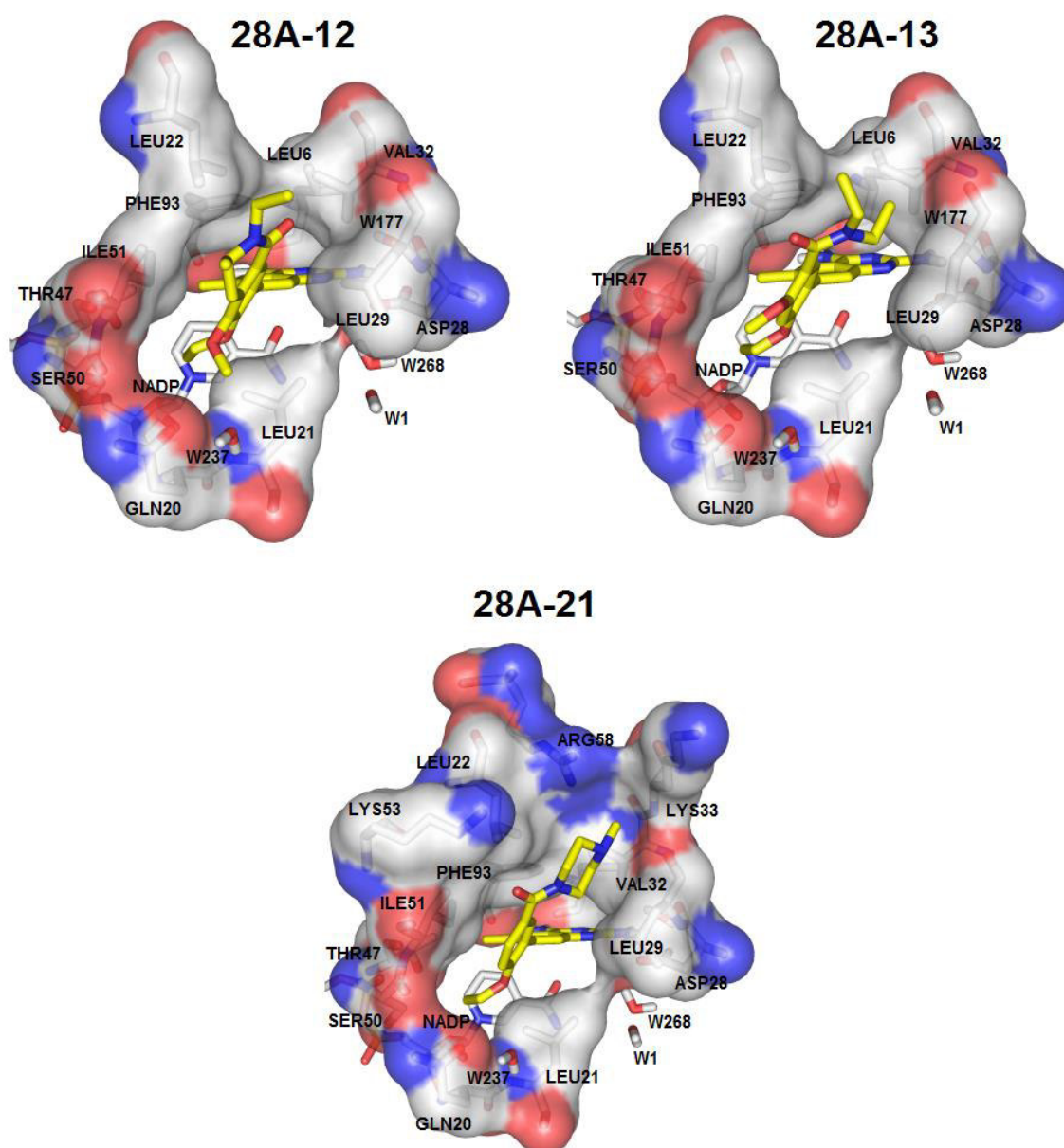
Todos os compostos que apresentaram atividades biológicas comparáveis ao ligante 28A pelo modelo de QSAR, satisfizeram as regras de Lipiniski e Veber para uma adequada biodisponibilidade oral (Figura 49). A análise de similaridade (*DrugLikeness* e *DrugScore*) dos 5 análogos (compostos 28A-12, 13, 14, 18 e 21) oriundos da etapa Lipiniski e Veber removeu 2 desses compostos (28A-14 e 28A-18).

Os 3 compostos restantes (28A-12, 28A-13 e 28A-21) apresentaram características farmacocinéticas e toxicológicas similares ao seu precursor, sendo escolhidos para uma análise mais detalhada.

A docagem dos três análogos propostos (Figura 50) revelou um padrão de interação do anel diaminoquinazolínico, similar ao encontrado para diaminoquinazolininas tanto em estruturas cristalográficas¹⁰¹, quanto nos resultados de docagem molecular obtidos no presente trabalho (Figuras 28-36).

Os três compostos apresentaram valores de ΔG_{lig} inferiores ao do seu precursor (28A), demonstrando-se compostos promissores do ponto de vista farmacodinâmico teórico. O menor valor do ΔG_{lig} do análogo 28A-21 (Tabela 11), pode ser justificado por uma maior complementariedade estereoquímica entre o grupo piperazil do referido ligante e a cavidade formada pelos aminoácidos leucina 29, valina 32, lisina 33, arginina 58 e leucina 22 (Figura 50).

Figura 50 – Docagem dos análogos propostos mais promissores. Os ligantes estão esboçados em amarelo e a enzima pelas cores cinza, vermelho e azul, indicando respectivamente os átomos de carbono, oxigênio e nitrogênio.



Os valores das constantes de inibição obtidas através do modelo de QSAR desenvolvido e validado no presente estudo, revelaram que os análogos 28A-12 e 28A-13 possuem uma potência 2 vezes maior que o composto 28A (Tabela 11). Estes análogos demonstram-se também entre 78 e 95 vezes mais potentes que o antimicrobiano de uso clínico trimetoprima (Tabela 11).

Tabela 11 – Características farmacocinéticas, farmacodinâmicas e físico-químicas dos análogos propostos selecionados.

Ligante	HIA (%)	F (%)	PPB (%)	K _i (nM)	ΔG _{lig} (kcal/mol)	logP	logS _{7,4}
TMP	97 ²⁴⁷	>63 ⁹⁶	40 ⁹⁶	1,24 ¹⁰¹	-	0,91*	-2,45
28A	100	75,97	100	0,035	-9,27	3,26	-6,62
28A-12	97,84	59,00	100	0,013	-9,37	3,35	-6,68
28A-13	100	68,36	100	0,016	-9,29	3,25	-6,59
28A-21	100	69,41	100	0,165	-9,73	2,55	-5,69

HIA – absorção intestinal humana, **F** – biodisponibilidade oral humana, **PPB** – ligação às proteínas plasmáticas, **logP** – logaritmo do coeficiente de partição octanol-água, **logS_{7,4}** – logaritmo da solubilidade a pH 7,4, **TMP** – trimetoprima, *(www.drugbank.ca).

Dentre os três compostos, o inibidor 28A-21 fora o único que apresentou perda de potência (5 vezes) em comparação ao composto 28A, embora ainda seja aproximadamente 8 vezes mais potente que o trimetoprima (Tabela 11). Apesar dessa perda de potência, indicada pelo modelo de QSAR, os resultados da docagem demonstram que o análogo 28A-21 apresenta o menor ΔG_{lig} dentre os três compostos (Tabela 11), indicando uma maior afinidade frente ao sítio ativo da SaDHFR.

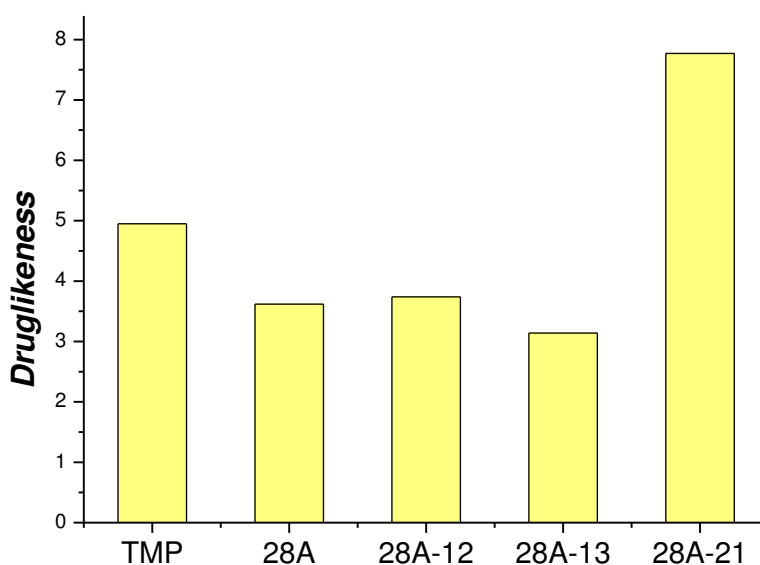
As modificações estruturais que levaram aos compostos 28A-12, 28A-13 e 28A-21 causaram uma discreta diminuição da biodisponibilidade oral humana, sendo a maior perda observada no análogo 28A-12 (Tabela 11), provavelmente devido a uma menor absorção intestinal humana causada pela sua baixa solubilidade e logP mais levado (Tabela 11).

Os três compostos propostos não apresentaram valores de ligação as proteínas plasmáticas inferiores a 100% (Tabela 11), indicando que esses

compostos se encontram fortemente ligados às mesmas, o que diminui a fração de moléculas livres e consequentemente ativas. Modificações estruturais futuras poderão ser realizadas para diminuir este valor e melhorar outros parâmetros farmacocinéticos, pois altos valores de ligação podem confinar o composto no compartimento plasmático originando um volume de distribuição baixo.

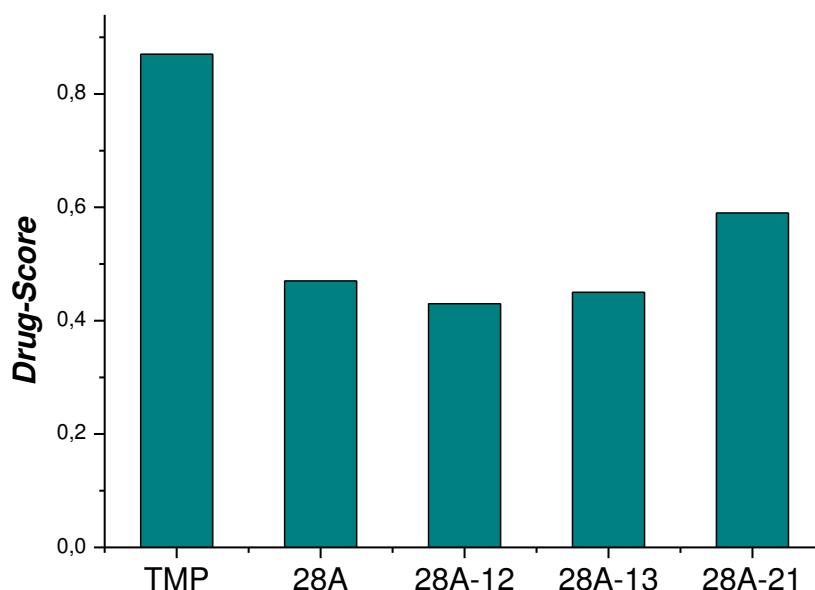
A análise de similaridade empregando o índice *Druglikeness*, indica que dentre os três análogos propostos, o 28A-13 fora o único com valor inferior ao composto de partida (Figura 51). O composto 28A-21 apresentou a maior similaridade estrutural, não apenas em comparação aos compostos 28A-12 e 28A-13, como também ao fármaco trimetoprima (Figura 51), o que incentiva posteriormente sua síntese e avaliação *in vitro*.

Figura 51 – Índice *Druglikeness* dos inibidores 28A, 28A-12, 28A-13, 28A-21 e do fármaco trimetoprima (TMP).



O uso do índice de similaridade *Drug-Score* revelou que as modificações estruturais que geraram os compostos 28A-12 e 28A-13, tiveram pouco impacto nos valores do referido índice (Figura 52). O composto 28A-21 apresentou um maior *Drug-Score* tanto em comparação com os compostos 28A-12 e 28A-13 quanto com o composto de partida (Figura 52), demonstrando-se um composto com características de similaridade estrutural e físico-químicas promissoras.

Figura 52 – Índice *Drug-Score* dos inibidores 28A, 28A-12, 28A-13, 28A-21 e do fármaco trimetoprima (TMP).



O modelo quantitativo para análise da cardiotoxicidade relacionada ao bloqueio do canal hERG indicou que os três análogos possuem uma maior segurança cardíaca teórica quando comparados ao composto 28A, visto que as probabilidades para o bloqueio diminuíram e as para o não-bloqueio aumentaram (Tabela 12).

Tabela 12 – Probabilidade de inibição do canal hERG

Ligante	Modelo Binário	Modelo Multiclasse
28A	Bloqueador (56%)	Não-bloqueador (48%)
28A-12	Bloqueador (51%)	Não-bloqueador (55%)
28A-13	Não-bloqueador (59%)	Não-bloqueador (62%)
28A-21	Não-bloqueador (53%)	Não-bloqueador (46%)
TMP	Não-bloqueador (85%)	Não-bloqueador (79%)
CPD	Bloqueador (89%)	Bloqueador Forte (75%)

TMP – trimetoprima, CPD – cisaprida.

5. CONCLUSÕES

O alinhamento das estruturas da SaDHFR com seus respectivos ligantes co-cristalizados, demonstrou importantes correlações entre as estruturas dos ligantes e a conformação do sítio ativo da SaDHFR, indicando, desta forma, a presença de aminoácidos flexíveis no sítio ativo.

Os resultados obtidos por alinhamento também facilitaram os protocolos de docagem, reduzindo o número de aminoácidos a serem considerados flexíveis. Além disso, o alinhamento facilitou a identificação de águas conservadas no sítio ativo da SaDHFR, as quais demonstraram ser importantes para a interação entre os ligantes e o sítio ativo da enzima.

As simulações de docagem molecular sugerem que o aumento da potência observado nos ligantes contendo o grupo metila no carbono 6, quando comparados aos seus análogos demetilados, ocorre provavelmente devido a interações de van der Waals, entre o referido grupo e a isoleucina 51. As interações de van der Waals justificam também o aumento de potência observados em ligantes substituídos na posição 2' e 3' da fenila no carbono 7, que ocorrem com os aminoácidos isoleucina 51, fenilalanina 93, leucina 55, valina 32, leucina 29 e os referidos ligantes.

A análise titulométrica teórica revelou a presença de quatro espécies para cada ligante em pH fisiológico, estando a espécie neutra em maior abundância seguida pela espécie carregada em N1.

A metodologia empregada na construção e validação de um modelo QSAR para explicar a inibição da SaDHFR, demonstrou-se robusta, visto que, fora possível estabelecer um modelo com significância estatística e capacidade de previsibilidade externa. Além disso, o modelo desenvolvido permitiu também estabelecer importantes inferências atômico-moleculares acerca dos mecanismos da inibição enzimática por 2,4-diaminoquinazolininas, os quais corroboram com os resultados obtidos por docagem molecular.

A escolha do composto 28A para otimização demonstrou-se eficiente visto que três dos análogos planejados (28A-12, 28A-13 e 28A-21) apresentaram características farmacodinâmicas, farmacocinéticas e toxicológicas teóricas promissoras que incentivam a posterior síntese e o ensaio *in vitro* desses compostos.

Diante de todos os resultados obtidos conclui-se que os métodos computacionais empregados foram úteis no planejamento de inibidores da enzima dihidrofolato redutase de *Staphylococcus aureus* com propriedades farmacodinâmicas, farmacocinéticas e toxicológicas teóricas promissoras. Assim os métodos computacionais demonstraram-se indispensáveis para o entendimento dos mecanismos moleculares da inibição enzimática da SaDHFR e na gênese de novos compostos antimicrobianos que empregam o moderno processo de desenvolvimento de fármacos, auxiliando na tomada de decisões de custo-benefício durante toda cadeia produtiva.

6. REFERÊNCIAS

1. Ou-Yang, S.; Lu, J.; Kong, X.; Liang, Z.; Luo, C.; Jiang, H. Computational Drug Discovery. *Acta Pharmacol. Sin.* **2012**, *33*, 1131-1140.
2. Prakash, N.; Devangi, P. Drug Discovery. *J. Antivir. Antiretrovir.* **2010**, *2*, 63-68.
3. Liao, C.; Sitzmann, M.; Pugliese, A.; Nicklaus, M. C. Computational Drug Discovery. *Future Med. Chem.* **2011**, *3*, 1057-1085.
4. Ferreira, R. S.; Oliva, G.; Andricopulo, A. D. Integração das Técnicas de Triagem Virtual e Triagem Biológica Automatizada em Alta Escala: Oportunidades e Desafios em P&D de Fármacos. *Quim. Nova.* **2011**, *34*, 1770-1778.
5. Capdeville, R.; Buchdunger, E.; Zimmermann, J.; Matter, A. Glivec (STI571, imatinib), a Rationally Developed, Targeted Anticancer Drug. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1*, 493-502.
6. Talele, T. T.; Khedkar, S. A.; Rigby, A. C. Successful Applications of Computer Aided Drug Discovery: Moving Drugs from Concept to the Clinic. *Curr. Top. Med. Chem.* **2010**, *10*, 127-141.
7. Ktzung, B. G. Farmacologia Básica e Clínica. 10rd ed.; Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2010.
8. Lloyd, N. C.; Morgan, H. W.; Nicholson, B. K.; Ronimus R. S. The Composition of Ehrlich's Salvarsan: Resolution of a Century-Old Debate. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, *44*, 941-944.
9. Golan, D. E. Princípios de Farmacologia - A Base Fisiopatológica da Farmacoterapia. 2rd ed.; Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2009.

10. Wright, P. M.; Seiple, I. B.; Myers, A. G. The Evolving Role of Chemical Synthesis in Antibacterial Drug Discovery. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2014**, 53, 8840-8869.
11. Sneader, W. Drug Discovery. John Wiley & Sons: Chichester, 2009.
12. Abraham, E. P.; Chain, E.; Fletcher, C. M.; Florey, H. W.; Gardner, A. D.; Heatley, N. G.; Jennings, M. A. Further Observations on Penicillin. *Lancet.* **1941**, 2, 177-188.
13. Rang, H. P.; Dale, M M.; Ritter, J. M.; Flower, R. J. Farmacologia. 6rd ed.; Elsevier: Rio de Janeiro, 2011.
14. Ritter, J. M.; Lewis, L. D.; Mant, T. G. K.; Ferro, A. A Textbook of Clinical Pharmacology and Therapeutics. 5rd ed.; Holdder Arnold: Great Britain, 2008.
15. Schaechter, M.; Engleberg, B. I.; Eisenstein, B. I., Medoff, G. Microbiologia – Mecanismos das Doenças Infecciosas. 3rd ed.; Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2009.
16. Tan, S. L.; Lee, H. Y.; Mahyudin, N. A. Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* Isolated from Food Handler's Hands. *Food Control.* **2014**, 44, 203-207.
17. Hackel, M.; Lascols, C.; Bouchillon, S.; Hilton, B.; Morgenstern, D.; Purdy, J. Serotype Prevalence and Antibiotic Resistance in *Streptococcus pneumoniae* Clinical Isolates Among Global Populations. *Vaccine.* **2013**, 31, 4881-4887.
18. Martinez, E.; Pérez, J. E.; Buevas, F.; Tovar, C.; Vanegas, N.; Stokes, H. W. Establishment and multi drug resistance evolution of ST235 *Pseudomonas aeruginosa* strains in the intensive care unit of a Colombian hospital. *Res. Microbiol.* **2014**, 165, 852-856.

19. Blanquer, R.; Rodrigo, T.; Casals, M.; Manzano, J. R.; García-García, J. M.; Calpe, J. L.; Valencia, E.; Pascual, T.; Mir, I.; Jiménez, M. A.; Canas, F.; Vidal, F.; Penas, A.; Caylà, J. A.; Resistance to First-Line Antituberculosis Drugs in Spain, 2010–2011. *Arch. Bronconeumol.* **2015**, 51, 24-30.

20. Wang, G.; Qian, W.; Zhang, X.; Wang, H.; Ye, K.; Bai, Y.; Zhou, G. Prevalence, Genetic Diversity and Antimicrobial Resistance of *Listeria Monocytogenes* Isolated from Ready-to-eat Meat Products in Nanjing, China. *Food Control.* **2015**, 50, 202-208.

21. Argudín, M. A.; Vanderhaeghen, W.; Butaye, P. Antimicrobial Resistance and Population Structure of *Staphylococcus Epidermidis* Recovered from Pig Farms in Belgium. *Vet. J.* **2015**, 203, 302-308.

22. Bockstael, K.; Aershot, A. V. Antimicrobial resistance in bacteria. *Cent. Eur. J. Med.* **2009**, 4, 141-155.

23. Silva, P. Farmacologia. 8rd ed.; Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2010.

24. Fukuda, K. *Antimicrobial Resistance - Global Report on Surveillance*; WHO: Geneva, 2014.

25. Santos, A. L.; Santos, D. O.; Freitas, C. C.; Ferreira B. L. A.; Afonso, I. F.; Rodrigues C. R.; Castro, H. C. *Staphylococcus aureus*: Visitando uma Cepa de Importância Hospitalar. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* **2007**, 43, 413-423.

26. Washer, P.; Joffe, H. The “hospital superbug”: Social Representations of MRSA. *Soc. Sci. Med.* **2006**, 63, 2141-2152.

27. Gelatti, L. C.; Bonamigo, R. R.; Becker, A. P.; d’Azevedo, P. A. *Staphylococcus aureus* Resistentes à Meticilina: Disseminação Emergente na Comunidade. *An. Bras. Dermatol.* **2009**, 84, 501-506.

28. Jevons, M. P. "Celbenin"- Resistant Staphylococci. *Brit. Med. J.* **1961**, 124, 124-125.

29. Liu, C.; Bayer, A.; Cosgrove, S. E.; Daum, R. S.; Fridkin, S. K.; Gorwitz, R. J.; Kaplan S. L.; Karchmer, A. W.; Levine, D. P.; Murray, B. E.; Rybak, M. J.; Talan, D. A.; Chambers, F. Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America for the Treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Infections in Adults and Children. *Clin. Infect. Dis.* **2011**, 52, 1-38.

30. Rebiahi, S. A.; Abdelouahid, D. E.; Rahmoun, M.; Abdelali, S.; Azzaoui, H. Azzaoui, Emergence of Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* Identified in the Tlemcen University Hospital (North-West Algeria). *Med. Mal. Infect.* **2011**, 41, 646-651.

31. Smith, T. L.; Pearson, M. L.; Wilcox, K. R.; Cruz, C.; Lancaster, M. V.; Robinson-Dunn, B.; Tenover, F. C.; Zervos, M. J.; Band, J. D.; White, E.; Jarvis, W. R. Emergence of Vancomycin-resistant in *Staphylococcus aureus*. *N. Engl. J. Med.* **1999**, 340, 493-501.

32. Howden, B. P.; Davies, J. K.; Johnson, P. D.; Stinear, T. P.; Grayson, M. L. Reduced Vancomycin Susceptibility in *Staphylococcus aureus*, Including Vancomycin-Intermediate and Heterogeneous Vancomycin-Intermediate Strains: Resistance Mechanisms, Laboratory Detection, and Clinical Implications. *Clin. Microbiol. Rev.* **2010**, 23, 99-139.

33. Lopes, H. V. CA-MRSA: Um Novo Problema para o Infectologista. *Rev. Panom. Infectol.* **2005**, 7, 34-36.

34. Buck, J. M; Como-Sabetti, K.; Harriman, K. H.; Danila, R. N.; Boxrud, D. J.; Glennen, A.; Lynfield, R. Community-associated Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Minnesota, 2000–2003. *Emerg. Infect. Dis.* **2005**, 11, 1532-1538.

35. Luna, C. M.; Noriega, E. R.; Bavestrello, L.; Gotuzzo, E. Tratamento de *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina na América Latina. *Braz. J. Infect. Dis.* **2010**, 14, S121-S129.
36. Dubey, D.; Ratch, S.; Sahu, M. C.; Rout, S.; Debata, N. K.; Padhy, R. N. A Report on Infection Dynamics of Inducible Clindamycin Resistance of *Staphylococcus aureus* Isolated from a Teaching Hospital in India. *Asian. Pac. J. Trop. Biomed.* **2013**, 3, 148-153.
37. Shoji, K.; Shinjoh, M.; Horikoshi, Y.; Tanq, J.; Watanabe, Y.; Sugita, K.; Tame, T.; Iwata, S.; Miyairi, I.; Saitoh, A. High Rate of Inducible Clindamycin Resistance in *Staphylococcus aureus* Isolates e A Multicenter Study in Tokyo, Japan. *J. Infect. Chemother.* **2015**, 21, 81-83.
38. Shittu, A. O.; Udo, E. E.; Lin, J. Phenotypic and Molecular Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolates Expressing Low- and High-Level Mupirocin Resistance in Nigeria and South Africa. *BMC. Infect. Dis.* **2009**, 9, 1-9.
39. Schmitz, F. J.; Krey, A.; Sadurski, R.; Verhoef, J.; Milatovic, D.; Fluit, A. C.; European SENTRY Participantes. Resistance to tetracycline and distribution of tetracycline resistance genes in European *Staphylococcus aureus* isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* **2001**, 47, 239-240.
40. Al-Shawwa, B. A.; Wegner, D. Trimethoprim-Sulfamethoxazole Plus Topical Antibiotics as Therapy for Acute Otitis Media With Otorrhea Caused by Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Children. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* **2005**, 131, 782-784.
41. Tenover, F. C.; Weigel, L. M.; Appelbaum, P. C.; McDougal, L. K.; Chaitram, J.; McAllister, S.; Clark, N.; Killgore, G.; O'Hara, C. M.; Jevitti, L.; Patel, J. B.; Bozdogan, B. Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolate from a Patient in Pennsylvania. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, 48, 275-280.

42. Endimiani, A.; Blackford, M.; Dasenbrook, E. C.; Reed, M. D.; Bajaksouszian, S.; Hujer, A. M.; Rudin, S. D.; Hujer, K. M.; Perreten, V.; Rice, L. B.; Jacobs, M. R.; Konstan, M. W.; Bonomo, R. A. Emergence of Linezolid-Resistant *Staphylococcus aureus* after Prolonged Treatment of Cystic Fibrosis Patients in Cleveland, Ohio. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, 55, 1684-1692.

43. Khan, M. F.; Neral, A.; Yadav, V. C.; Khan, F. A.; Ahmed, S. Emergence of Linezolid Resistant *Staphylococcus aureus* in Bastar Tribal Region, India. *J. Microbiol. Infect. Dis.* **2012**, 2, 127-128.

44. Elsaghier, A. A. F.; Auken, H. M.; Hamilton-Miller, J. M.; Shaw, S.; Kibbler, C. C. Resistance to Teicoplanin Developing During Treatment of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Infection. *J. Antimicrob. Chemother.* **2002**, 49, 423-430.

45. Marty, F. M.; Yeh, W. W.; Wennersten, C. B.; Venkataraman, L.; Albano, E.; Alyea, E. P.; Gold, H. S.; Baden, L. R.; Pillai, S. K. Emergence of a Clinical Daptomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolate During Treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Bacteremia and Osteomyelitis. *J. Clin. Microbiol.* **2006**, 44, 595-597.

46. Rensburg, M. J. J.; Whitelaw, A. C.; Elisha, B. G. Genetic Basis of Rifampicin Resistance in Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Suggests Clonal Expansion in Hospitals in Cape Town, South Africa. *BMC Microbiol.* **2012**, 12, 1-7.

47. Dabul, A. N.; Camargo, I. L. Molecular Characterization of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Resistant to Tigecycline and Daptomycin Isolated in a Hospital in Brazil. *Epidemiol. Infect.* **2014**, 142, 479-483.

48. Werner, G.; Cuny, C.; Schmitz, F. J.; Witte, W. Methicillin-Resistant, Quinupristin-Dalfopristin-Resistant *Staphylococcus aureus* with Reduced Sensitivity to Glycopeptides. *J. Clin. Microbiol.* **2001**, 39, 3586-3590.

49. Nakhla, L. S. Resistance of *Staphylococcus aureus* to Sulphamethoxazole and Trimethoprim. *J. Clin. Pathol. Chemother.* **1972**, 25, 708-712.
50. Lima-Pallone, J. A; Catharino, R. R.; Godoy, H. T. Folatos em Brócolis Convencional e Orgânico e Perdas no Processo de Cocção em Água. *Quim. Nova.* **2008**, 31, 530-535.
51. Shils, M. E.; Shike, M.; Ross, A. C.; Caballero, B.; Cousins, R. J. Nutrição Moderna na Saúde e na Doença. 10rd ed.; Manole: São Paulo, 2009.
52. Scholl, T. O.; Johnson, W. G. Folic acid: Influence on the Outcome of Pregnancy. *Am. J. Clin. Nutr.* **2000**, 71, 1295S-1303S.
53. Engelking, L. R. Textbook of Veterinary Physiological Chemistry. 2nd ed.; Elsevier: Kidlington, 2011.
54. Gonen, N.; Assaraf, Y. G. Antifolates in Cancer Therapy: Structure, Activity and Mechanisms of Resistance. *Drug Resist. Updat.* **2012**, 15, 183-210.
55. Tibbetts, A. S.; Appling, D. R. Compartmentalization of Mammalian Folate-Mediated One-Carbon Metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* **2010**, 30, 57-81.
56. Fowler, B. The Folate Cycle and Disease in Humans. *Kidney Int. Suppl.* **2001**, 59, 221-229.
57. Sharp, L.; Little, J. Polymorphisms in Genes Involved in Folate Metabolism and Colorectal Neoplasia: A HuGE Review. *Am. J. Epidemiol.* **2004**, 159, 423-443.
58. Stanger, O. Physiology of Folic Acid in Health and Disease. *Curr. Drug. Metab.* **2002**, 3, 211-223.
59. Vanoni, M. A.; Ballou, D. P.; Matthews, R. G. Methylenetetrahydrofolate Reductase. *J. Biol. Chem.* **1983**, 258, 11510-11514.

60. Chiang, P. K.; Gordon, R. K.; Tal, J.; Zeng, G. C.; Doctor, B. P.; Pardhasaradhi, K.; McCann, P. P. S-Adenosylmethionine and Methylation. *FASEB J.* **1996**, 10, 471-480.

61. Bourne, C. R. Utility of the Biosynthetic Folate Pathway for Targets in Antimicrobial Discovery. *Antibiotics.* **2014**, 3, 1-28.

62. Rengarajan, J.; Sassetti, C. M.; Naroditskaya, V.; Sloutsky, A.; Bloom, B. R.; Rubin, E. J. The Folate Pathway is a Target for Resistance to the Drug Para-aminosalicylic acid (PAS) in Mycobacteria. *Mol. Microbiol.* **2004**, 53, 275-282.

63. Swarbrick, J.; Iliades, P.; Simpson, J. S.; Macreadie, I. Folate Biosynthesis – Reappraisal of Old and Novel Targets in the Search for New Antimicrobials. *Open. Enzym. Inhib. J.* **2008**, 1, 12-33.

64. Jansen, G.; Weijers, K.; Blits, M.; Heijden, J.; Gent, Y.; Al, M.; Laken, C.; Molthoff, C.; Verweij, C.; Voskuil, A.; Lems, W.; Scheper, R.; Peters, G.; Ratnam, M.; Aassaraf, Y.; Dijkmans, B. Folates and Antifolates in Rheumatoid Arthritis. *Pteridines.* **2013**, 24, 21-26.

65. Onyeneko, N. G.; Orji, B. C.; Okeibunor, J. C.; Brieger, W. R. Characteristics of Nigerian Women Taking Sulfadoxine/pyrimethamine Twice During Pregnancy for the Prevention of Malaria. *Int. J. Gynaecol. Obstet.* **2013**, 123, 101-104.

66. Baquero-Artigao, F.; Martín, F. C.; Corripio, I. F.; Mellgren, A. G.; Guasch, C. F.; Fernández-Miranda, M. C.; González-Tomé, M. I.; Gianzo, J. A. C.; Neth, O.; Amador, J. T. R. y Grupo de Trabajo de Infección Congénita y Perinatal de la Sociedad Espanola de Infectología Pediátrica (SEIP). Guía de la Sociedad Espanola de Infectología Pediátrica para el diagnóstico y tratamiento de la toxoplasmosis congénita. *An. Pediatr.* **2013**, 79, 116.e1-116.e16.

67. Cadena, J.; Nair, S.; Henao-Martinez, A. F.; Jorgensen, J. H.; Patterson, J. E.; Sreeramoju, P. V. Dose of Trimethoprim-Sulfamethoxazole To Treat Skin and

Skin Structure Infections Caused by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, 55, 5430-5432.

68. Caselli, D.; Petris, M. G.; Rondelli, R.; Carraro, F.; Colombini, A.; Muggeo, P.; Zino, O.; Melchionda, F.; Russo, G.; Pierani, P.; Soncini, E.; DeSantis, R.; Zanazzo, G.; Barrone, A.; Cesaro, S.; Cellini, M.; Mura, R.; Milano, G. M.; Meazza, C.; Cicalese, M. P.; Tropia, S.; De Mais, S.; Castagnola, E.; Aricò, M.; Infectious Diseases Working Group of the Associazione Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica. Single-Day Trimethoprim/Sulfamethoxazole Prophylaxis for Pneumocystis Pneumonia in Children with Cancer. *J. Pediatr.* **2014**, 164, 389-392.

69. Kuhn, A.; Ruland, V.; Bonsmann, G. Cutaneous Lupus Erythematosus: Update of Therapeutic Options Part II. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2011**, 65, e195-e213.

70. Sparks, J. A.; McSparron, J. L.; Shan, N.; Aliabadi, P.; Paulson, V.; Fanta, C. H.; Coblyn, J. S. Osseous Sarcoidosis: Clinical Characteristics, Treatment, and Outcomes—Experience from a Large, Academic Hospital. *Semin. Arthritis. Rheum* **2014**, 44, 371-379.

71. Sawaya, M. R.; Kraut, J. Loop and Subdomain Movements in the Mechanism of *Escherichia coli* Dihydrofolate Reductase: Crystallographic Evidence. *Biochemistry.* **1997**, 36, 586-603.

72. Ma, X.; Chui, W. K. Antifolate and Antiproliferative Activity of 6,8,10-triazaspiro[4.5]deca-6,8-dienes and 1,3,5-triazaspiro[5.5]undeca-1,3-dienes. *Bioorg Med. Chem.* **2010**, 18, 737-743.

73. Sharma, M.; Chauham, P. M. Dihydrofolate Reductase as Therapeutics Target for Infectious Diseases: Opportunities and Challenges. *Future Med. Chem.* **2012**, 4, 1335-1365.

74. Delfino, R. T.; Santos-Filho, O. A; Figueroa-Villar, J. D. Type 2 Antifolates in the Chemotherapy of falciparum Malaria. *J. Braz. Chem. Soc.* **2002**, 13, 727-741.
75. Pospisil, P.; Ballmer, P.; Scapozza, L.; Folkers, G. Tautomerism in Computer-Aided Drug Design. *J. Recept. Sig. Transd.* **2003**, 23, 361-371.
76. Soniat, M.; Martin, C. B. Theoretical Study on the Relative Energies of Neutral Pterin Tautomers. *Pteridines.* **2008**, 19, 120-124.
77. Lee, H.; Reyes, V. M.; Kraut, J. Crystal Structures of Escherichia coli Dihydrofolate Deductase Complexed with 5-formyltetrahydrofolate (folinic acid) in two Space Groups: Evidence for Enolization of Pteridine O4. *Biochemistry.* **1996**, 35, 7012-7020.
78. Cannon, W. R.; Garrison, B. J.; Benkovic, S. J. Electrostatic Characterization of Enzyme Complexes: Evaluation of the Mechanism of Catalysis of Dihydrofolate Reductase. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 2386-2395.
79. Cheung, H. T.; Birdsall, B.; Frenkiel, T. A.; Chau, D. D.; Feeney, J. ¹³C NMR Determination of the Tautomeric and Ionization States of Folate in its Complexes with *Lactobacillus casei* Dihydrofolate Reductase. *Biochemistry.* **1993**, 32, 6846-6854.
80. Wan, Q.; Bennette, B. C.; Wilson, M. A.; Kovalevsky, A.; Langan, P.; Howell, E. E.; Dealwis, C. Toward Resolving the Catalytic Mechanism of Dihydrofolate Reductase Using Neutron and Ultrahigh-resolution X-ray crystallography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2014**, 111, 18225-18230.
81. Polshakov, V. I. Dihydrofolate Reductase: Structural Aspects of Mechanisms of Enzyme Catalysis and Inhibition. *Russ. Chem. Bull.* **2001**, 50, 1733-1751.
82. Liu, C. T.; Francis, K.; Layfield, J. P.; Huang, X.; Hammes-Schiffer, S.; Kohen, A.; Benkovic, S. J. *Escherichia coli* Dihydrofolate Reductase Catalyzed Proton

and Hydride Transfers: Temporal Order and the Roles of Asp27 and Tyr100. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **2014**, 111, 18231-18236.

83. Singh, P.; Abeysinghe, T.; Kohen, A. Linking Protein Motion to Enzyme Catalysis. *Molecules*. **2015**, 20, 1192-1209.

84. Villafranca, J. E.; Howell, E. E.; Voet, D. H.; Strobel, M. S.; Ogden, R. C. ; Abelson, J. N.; Kraut, J. Directed Mutagenesis of Dihydrofolate Reductase. *Science*. **1983**, 222, 782-788.

85. Howell, E. E.; Villafranca, J. E.; Warren, M. S.; Oatley, S.J.; Kraut, J. Functional Role of Aspartic Acid-27 in Dihydrofolate Reductase Revealed by Mutagenesis. *Science*. **1986**, 231, 1123-1128.

86. Andrés, J.; Moliner, V.; Safont, V. S.; Domingo, L. R.; Picher, M. T.; Krechl, J. On Transition Structures for Hydride Transfer Step: A Theoretical Study of the Reaction Catalyzed by Dihydrofolate Reductase Enzyme. *Bioorg. Chem*. **1996**, 24, 10-18.

87. Bajorath, J.; Kraut, J.; Li, Z.; Kitson, D. H.; Hagler, A. T. Theoretical Studies on the Dihydrofolate Reductase Mechanism: Electronic Polarization of Bound Substrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **1991**, 88, 6423-6426.

88. Agarwal, P. K.; Billeter, S. R.; Hammes-Schiffer, S. Nuclear Quantum Effects and Enzyme Dynamics in Dihydrofolate Reductase Catalysis. *J. Phys. Chem*. **2002**, 106, 3283-3293.

89. Gready, J. E. Theoretical Studies on the Activation of the Pterin Cofactor in the Catalytic Mechanism of Dihydrofolate Reductase. *Biochemistry*. **1985**, 24, 4761-4766.

90. Khavrutskii, I. V.; Price, D. J.; Lee, J.; Brooks, C. L. Conformational Change of the Methionine 20 loop of Escherichia coli Dihydrofolate Reductase Modulates pKa of the Bound Dihydrofolate. *Protein Sci*. **2007**, 16, 1087-1100.

91. Cronstein, B. N.; Bertino, J. R. Methotrexate; Springer Science & Business Media, 2000.
92. Heinle, R. W.; Welch, A. D. Experiments with Pteroylglutamic acid and Pteroylglutamic acid Deficiency in Human Leukemia. *J. Clin. Invest.* **1948**, 27, 539.
93. Farber, S.; Diamond, L. K.; Mercer, R. D.; Sylvester, R. F.; Wolff, J. A. Temporary Remissions in Acute Leukemia in Children Produced by Folic Acid Antagonist, 4-aminopteroyl-glutamic acid (aminopterin). *N. Engl. J. Med.* **1948**, 238, 787-793.
94. El-Subbagh, H.I.; Hassan, G. S.; El-Messery, S. M.; Al-Rashood, S. T.; Al-Omary, F. A.; Abulfadl, Y. S.; Shabayek, M. I. Nonclassical Antifolates, part 5. Benzodiazepine Analogs as a new class of DHFR Inhibitors: Synthesis, Antitumor testing and Molecular Modeling Study. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, 74, 234-245.
95. Hassan, G. S.; El-Messery, S. M.; Al-Omary, F. A.; Al-Rashood, S. T.; Shabayek, M. I.; Abulfadl, Y. S.; Habib, el-SE; El-Hallouty, S. M.; Fayad, W.; Mohamed, K. M.; El-Menshawi, B. S.; El-Subbagh, H. I. Nonclassical Antifolates, part 4. 5-(2-Aminothiazol-4-yl)-4-phenyl-4H-1,2,4-triazole-3-thiols as a new class of DHFR Inhibitors: Synthesis, Biological Evaluation and Molecular Modeling Study. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, 66, 135-145.
96. Brunton, L. L.; Lazo, J. S.; Parker, K. L. Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 11rd ed.; McGraw-Hill Interamericana do Brasil: Rio de Janeiro, 2006.
97. Allegra, C. J.; Chabner, B. A.; Tuazon, C. U.; Ogata-Arakaki, D.; Baird, B.; Drake, J. C.; Simmons, J. T. ; Lack, E. E.; Shelhamer, J. H.; Balis, F. Trimetrexate for the Treatment of *Pneumocystis carinii* Pneumonia in Patients with the Acquired Immunodeficiency Syndrome. *N. Engl. J. Med.* **1987**, 317, 978-985.

98. Vogelzang, N. J.; Rusthoven, J. J.; Symanowski, J.; Denham, C.; Kaukel, E.; Ruffie, P.; Gatzemeier, U.; Boyer, M.; Emri, S.; Manegold, C.; Niyikiza, C.; Paoletti, P. Phase III Study of Pemetrexed in Combination with Cisplatin versus Cisplatin Alone in Patients with Malignant Pleural Mesothelioma. *J. Clin. Oncol.* **2003**, 21, 2636-2644.

99. Ravina, E. The Evolution of Drug Discovery: From Traditional Medicines to Modern Drugs. Wiley-VCH: Santiago de Compostela, 2011.

100. Anderson, R. J.; Groundwater, P. W.; Tood, A.; Worsley, A. J. Antibacterial Agents: Chemistry, Mode of Action, Mechanisms of Resistance and Clinical Applications. Wiley, 2012.

101. Li, X.; Hilgers, M.; Cunningham, M.; Chen, Z.; Trzoss, M.; Zhang, J.; Kohnen, L.; Lam, T.; Creighton, C.; Kedar, G. C.; K; Nelson, K.; Kwan, B.; Stidham, M.; Brown-Driver, V.; Shaw, K. J.; Finn, J. Structure-based Design of new DHFR-based Antibacterial Agents: 7-aryl-2,4-diaminoquinazolines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, 21, 5171-5176.

102. Dale, G. E.; Broger, C.; D'Arcy, A.; Hartman, P. G.; DeHoogt, R.; Jolidon, S.; Kompis, I.; Labhardt, A. M.; Langen, H.; Locher, H.; Page, M. G.; Stüber, D.; Then, R. L.; Wipf, B.; Oefner, C. A Single Amino Acid Substitution in *Staphylococcus aureus* Dihydrofolate Reductase Determines Trimethoprim Resistance. *J. Mol. Biol.* **1997**, 266, 23-30.

103. Oefner, C.; Bandera, M.; Haldimann, A.; Laue, H.; Schulz, H.; Parisi, S.; Weiss, L.; Lociuro, S.; Dale, G. E. Increased Hydrophobic Interactions of Iclaprim with *Staphylococcus aureus* Dihydrofolate Reductase are Responsible for the Increase in Affinity and Antibacterial Activity. *J. Antimicrob. Chemother.* **2009**, 63, 687-698.

104. Peppard, W. J.; Schuenke, C. D. Iclaprim, a Diaminopyrimidine Dihydrofolate Reductase Inhibitor for the Potential Treatment of Antibiotic-resistant staphylococcal Infections. *Curr. Opin. Investig. Drugs.* **2008**, 9, 210-225.

105. European Medicines Agency. Withdrawal Assessment Report for Mersarex (iclaprim mesylate), London, 2009.
106. Sant'Anna, C. M. R. Métodos de Modelagem Molecular para Estudo e Planejamento de Compostos Bioativos: Uma introdução. *Rev. Virtual Quim.* **2009**, 1, 49-57.
107. Barreiro, E. J.; Rodrigues, C. R.; Albuquerque, M. G.; de Sant'Anna, C. M. R.; Alencastro, R. B. Modelagem Molecular: uma Ferramenta para o Planejamento Racional de Fármacos em Química Medicinal. *Quim. Nova* **1997**, 20, 300-310.
108. Ramachandran, K. L.; Deepa, G.; Namboori, K. Computational Chemistry and Molecular Modeling: Principles and Applications. Springer, 2008.
109. Andrei, C. C.; Ferreira, D. T.; Faccione, M.; Faria, T. J. Da Química Medicinal à Química Combinatória e Modelagem Molecular. Manole, 2003.
110. Kitchen, D. B.; Decornez, H.; Furr, J. R.; Bajorath, J. Docking and Scoring in Virtual Screening for Drug Discovery: Methods and Application. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2004**, 3, 935-949.
111. Huang, S. Y.; Grinter, S. Z.; Zou, X. Scoring Functions and their Evaluation Methods for Protein–ligand Docking: Recent Advances and Future Directions. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, 12, 12899-12908.
112. Leach, A. R. *Molecular Modelling*. Prentice Hall, 2001.
113. Carvalho, I.; Pupo, M. T.; Borges, A. D. L.; Bernardes, L. S. C. Introdução a Modelagem Molecular de Fármacos no Curso Experimental de Química Farmacêutica. *Quim. Nova.* **2003**, 26, 428-438.

114. Guest, M. F.; Bush, I. J.; Van Dam, H. J. J.; Sherwood, P.; Thomas, J. M. H.; Van Lenthe, J. H.; Havenith, R. W. A.; Kendrick, J. The GAMESS-UK Electronic Structure Package: Algorithms, Developments and Applications. *Mol. Physics*. **2005**, 103, 719-747.
115. Puzyn, T.; Leszczynski, J.; Cronin, M. T. D.; Recent Advances in QSAR Studies: Methods and Applications. Springer, 2010.
116. Sousa, S. F.; Ribeiro, A. J.; Coimbra, J. T.; Neves, R. P.; Martins, S. A.; Moorthy, N. S.; Fernandes, P. A.; Ramos, M. J. Protein-Ligand Docking in the New Millennium – A Retrospective of 10 Years in the Field. *Curr. Med. Chem*. **2013**, 20, 2296-2314.
117. Ogawa, T. Protein Engineering – Technology and Application. InTech, 2013.
118. McConkey, B. J.; Sobolev, V.; Edelman, M. The Performance of Current Methods in Ligand–protein Docking. *Curr. Sci*. **2002**, 83, 845-856.
119. Meng, X.Y.; Zhang, H. X.; Mezei, M.; Cui, M. Molecular Docking: A Powerful Approach for Structure-based Drug Discovery. *Curr. Comput. Aided. Drug. Des*. **2011**, 7, 146-157.
120. Pettersen, E. F.; Goddard, T. D.; Huang, C. C.; Couch, G. S.; Greenblatt, D. M.; Meng, E. C.; Ferrin, T. E. UCSF Chimera--A Visualization System for Exploratory Research and Analysis. *J. Comput. Chem*. **2004**, 25, 1605-1612.
121. Morris, G. M.; Goodsell, D. S.; Halliday, R. S.; Huey, R.; Hart, W. E.; Belew, R. K.; Olson, A. J. Automated Docking using a Lamarckian Genetic Algorithm and an Empirical Binding Free Energy Function. *J. Comp. Chem*. **1998**, 19, 1639-1662.
122. Venkatachalam, C. M.; Jiang, X.; Oldfield, T.; Waldman, M. LigandFit: A Novel Method for the Shape-directed Rapid Docking of Ligands to Protein Active Sites. *J. Mol. Graph. Model*. **2003**, 21, 289-307.

123. Jain, A. N. Surflex: Fully Automatic Flexible Molecular Docking using a Molecular Similarity-based Search Engine. *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 499-511.
124. Schnecke, V.; Kuhn, L. A. Virtual Screening with Solvation and Ligand-induced Complementarity. *Perspect. Drug Discovery Des.* **2000**, 20, 171-190.
125. Totrov, M.; Abagyan, R. Flexible Protein–Ligand Docking by Global Energy Optimization in Internal Coordinates. *Proteins.* **1997**, S1, 215-220.
126. McMartin, C.; Bohacek, R. S. QXP: Powerful, Rapid Computer Algorithms for Structure-based Drug Design. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **1997**, 11, 333-344.
127. Rarey, M.; Kramer, B.; Lengauer, T.; Klebe, G. A Fast Flexible Docking Method using an Incremental Construction Algorithm. *J. Mol Biol.* **1996**, 261, 470-489.
128. Atilgan, E.; Hu, J. Improving Protein Docking Using Sustainable Genetic Algorithms. *Int J. Comp. Inf. Syst. Ind. Manag. Applic.* **2011**, 3, 248-255.
129. Crisan, M. Convergence and Hybrid Information Technologies. InTech, 2010.
130. Abe, K.; Kobayashi, N.; Sode, K.; Ikebukuro, K. Peptide Ligand Screening of α -synuclein Aggregation Modulators by *in silico* Panning. *BMC Bioinformatics.* **2007**, 8, 451-458.
131. Kroemer, R. T. Structure-Based Drug Design: Docking and Scoring. *Curr. Protein Pept Sci.* **2007**, 8, 312-328.
132. Muegge, I. A Knowledge-based Scoring Function for Protein-ligand Interactions: Probing the Reference Statate. *Perspect. Drug Discovery Des.* **2000**, 20, 99-114.

133. Gohlke, H.; Hendlich, M.; Klebe, G. Knowledge-based Scoring Function to Predict Protein-Ligand Interactions. *J. Mol. Biol.* **2000**, 295, 337-356.
134. DeWitte, R. S.; Shakhnovich, E. L. SMOG: de Novo Design Method Based on Simple, Fast, and Accurate Free Energy Estimates. 1. Methodology and Supporting Evidence. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 11733-11744.
135. Mitchell, J. B. O.; Laskowski, R. A.; Alex, A.; Forster, M. J.; Thornton, J. M. BLEEP—Potential of Mean Force Describing Protein–ligand Interactions: II. Calculation of Binding Energies and Comparison with Experimental Data. *J. Comput. Chem.* **1999**, 20, 1177-1185.
136. Böhm, H. J. LUDI: Rule-based Automatic Design of New Substituents for Enzyme Inhibitor Leads. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **1992**, 6, 593-606.
137. Gohlke, H.; Klebe, G. Statistical Potentials and Scoring Functions Applied to Protein–ligand Binding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2001**, 11, 231-235.
138. Goodsell, D. S.; Olson, A. J. Automated Docking of Substrates to Proteins by Simulated Annealing. *Proteins.* **1990**, 8, 195-202.
139. Morris, G. M.; Goodsell, D. S.; Huey, R.; Olson A. J. Distributed Automated Docking of Flexible Ligands to Proteins: Parallel Applications of AutoDock 2.4. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1996**, 10, 293-304.
140. Huey, R.; Morris, G. M.; Olson, A. J.; Goodsell, D. S. A Semiempirical Free Energy Force Field with Charge-Based Desolvation. *J. Comput. Chem.* **2007**, 28, 1145-1152.
141. Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *J. Comput. Chem.* **2009**, 30, 2785-2791.

142. Trott, O.; Olson, A. J. AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a new Scoring Function, Efficient Optimization and Multithreading. *J. Comput. Chem.* **2010**, 31, 455-461.
143. Kang, L.; Li, H.; Jiang, H.; Wang, X. An Improved Adaptive Genetic Algorithm for Protein–ligand Docking. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **2009**, 23, 1-12.
144. Verdonk, M. L.; Cole, J. C.; Hartshorn, M. J.; Murray, C. W.; Taylor, R. D. Improved Protein–Ligand Docking Using GOLD. *Protein*, **2003**, 52, 609-623.
145. Xiong, J. Essential Bioinformatics. Cambridge, 2006.
146. Berman, H. M.; Bhat, T. N.; Bourne, P. E.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Weissig, H.; Westbrook, J. The Protein Data Bank and the Challenge of Structural Genomics. *Nat. Struct. Biol.*, **2000**, 7, 957-959.
147. Westbrook, J.; Feng, Z.; Chen, L.; Yang, H.; Berman, H. M. The Protein Data Bank and Structural Genomics. *Nucleic. Acids Res.* **2003**, 31, 489-491.
148. Shoichet, B. K.; McGovern, S. L.; Wei, B.; Irwin, J. J. Lead Discovery Using Molecular Docking. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, 6, 439-446.
149. Doman, T. N., McGovern, S. L.; Witherbee, B. J.; Kasten, T. P.; Kurumbail, R.; Stallings, W. C.; Connolly, D. T.; Shoichet, B. K. Molecular Docking and High-Throughput Screening for Novel Inhibitors of Protein Tyrosine Phosphatase-1B. *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 2213-2221.
150. Paiva A. M.; Vanderwall, D. E.; Blanchard, J. S.; Kozarich, J. W.; Williamson, J. M.; Kelly, T. M. Molecular Docking and High-Throughput Screening for Novel Inhibitors of Protein Tyrosine Phosphatase-1B. *Biochim. Biophys. Acta.* **2001**, 1545, 67-77.

151. Chatterjee, A.; Cutler, S. J.; Doerksen, R. J.; Khan I. A.; Williamson, J. S. Discovery of Thienquinolone Derivatives as Selective and ATP Non-competitive CDK5/p25 Inhibitors by Structure-based Virtual Screening. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, 6409, 6409-6421.
152. Polgár, T.; Keseru, G. M. Integration of Virtual and High Throughput Screening in Lead Discovery Settings *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **2011**, 14, 889-897.
153. Smusz, S.; Kurczab, R.; Satała, G.; Bojarski, A. J. Fingerprint-based Consensus Virtual Screening Towards Structurally new 5-HT₆R Ligands. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, 25, 1827-1830.
154. Zhan, W. Li, D.; Che, J.; Zhang, L.; Yang, B.; Hu, Y.; Liu, T.; Dong, X. Integrating Docking Scores, Interaction Profiles and Molecular Descriptors to Improve the Accuracy of Molecular Docking: Toward the Discovery of Novel Akt1 Inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, 75, 11-20.
155. Cai, H.; Liu, Q.; Gao, D.; Wang, T.; Chen, T.; Yan, G.; Chen, K.; Xu, Y.; Wang, H.; Li, Y.; Zhu, W. Novel Fatty Acid Binding Protein 4 (FABP4) Inhibitors: Virtual Screening, Synthesis and Crystal Structure Determination. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, 90, 241-250.
156. Wang, Y.; Hess, T. N.; Jones, V.; Zhou, J. Z.; McNeil, M. R.; Andrew McCammon, J. Novel Inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* dTDP-6-deoxy-L-lyxo-4-hexulose Reductase (RmlD) Identified by Virtual Screening. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, 21, 7064-7067.
157. Kim, J. T.; Jung, S. H.; Kang, S. Y.; Ryu, C. K.; Kang, N. S. The Discovery of Aurora Kinase Inhibitor by Multi-Docking-Based Virtual Screening. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, 15, 20403-20412.

158. Grover, I. I.; Singh, I. I.; Bakshi, I. I. Quantitative Structure–property Relationships in Pharmaceutical Research – Part 1. *Pharm. Sci. Technol. Today*. **2000**, 3, 28-35.
159. Brown, A. C.; Fraser, T. R. On the Connection Between Chemical Constitution and Physiological Action. Part 1. On the Physiological Action of the Salts of the Ammonium Bases, Derived from Strychnia, Brucia, Thebia, Codeia, Morphia, and Nicotia. *J. Anat. Physiol.* **1868**, 2, 224-242.
160. Hammett, L. P. Physical Organic Chemistry: Reaction Rates, Equilibria and Mechanisms. McGraw-Hill, 1940.
161. Fujita, T. ; Iwasa, J.; Hansch, C. A New Substituent Constant, π , Derived from Partition Coefficients. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, 86, 5175-5180.
162. Hansch, C. Quantitative Approach to Biochemical Structure-activity Relationships. *Acc. Chem. Res.* **1969**, 2, 232-239.
163. Free, S. M. Jr.; Wilson, J. W. A Mathematical Contribution to Structure-Activity Studies. *J. Med. Chem.* **1964**, 7, 395-399.
164. Kubinyi, H. Nonlinear Dependence of Biological Activity on Hydrophobic Character: the Bilinear Model. *Farmaco Sci.* **1979**, 34, 248-276.
165. Todeschini, R.; Consonni, V. Handbook of Molecular Descriptors. Wiley-VCH: Weinheim. 2000.
166. Dudek, A. Z.; Arodz, T.; Gálvez, J. Computational Methods in Developing Quantitative Structure-Activity Relationships (QSAR): A Review. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **2006**, 9, 213-228.
167. Gaudio, A. C.; Zandonade, E. Proposição, Validação e Análises dos Modelos que Correlacionam Estrutura Química e Atividade Biológica. *Quim. Nova*. **2001**, 24, 658-671.

168. Krogsgaard-Larsen, T.; Liljefors, T.; Madsen, U. Textbook of Drug Design and Discovery. Taylor&Francis: London. 2002.
169. Ekins, S. Computer Applications in Pharmaceutical Research and Development. Wiley: New Jersey, 2006.
170. Khojasteh, S. C.; Wong, H.; Hop, C. E. C. A. Drug Metabolism and Pharmacokinetics Quick Guide. Springer: New York, 2011.
171. Hillery, A. N.; Loyd, A. W.; Swarbrick, J. Drug Delivery and Targeting for Pharmacists and Pharmaceutical Scientists. Taylor&Francis: London, 2005.
172. Kerns, E. H.; Di, L. Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods. Elsevier: San Diego, 2008.
173. van de Waterbeemd, H.; Gifford, E. ADMET in silico modelling: Towards Prediction Paradise?. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2003**, 2, 192-204.
174. Moda, T. L.; Andricopulo, A. D. Consensus Hologram QSAR Modeling for the Prediction of Human Intestinal Absorption. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, 22, 2889-2893.
175. Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **2001**, 46, 3-26.
176. Veber, D. F.; Johnson, S. R.; Cheng, H. Y.; Smith, B. R.; Ward, K. W.; Kopple, K. D. Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. *J. Med. Chem.* **2002**, 46, 2615-2623.
177. Kennedy, T. Managing the Drug Discovery/Development Interface. *Drug Disc. Today.* **1997**, 2, 436-444.

178. Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **1997**, 23, 3-26.
179. Xu, X.; Zhang, W.; Huang, C.; Li, Y.; Yu, H.; Wang, Y.; Duan, J.; Ling, Y.; A Novel Chemometric Method for the Prediction of Human Oral Bioavailability. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, 13, 6964-6982.
180. Moda, T. L.; Montanari, C. A.; Andricopulo, A. D. Hologram QSAR model for the prediction of human oral bioavailability. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, 15, 7738-7745.
181. Moda, T. L.; Montanari, C. A.; Andricopulo, A. D. In Silico Prediction of Human Plasma Protein Binding Using Hologram QSAR. *Lett. Drug Des. Discov.* **2007**, 4, 502-509.
182. Moda, T. L.; Carrara, A. E.; Andricopulo, A. D. A Fragment-Based Approach for the in Silico Prediction of Blood-Brain Barrier Permeation. *J. Braz. Chem.* **2012**, 23, 2191-2196.
183. Yoshida, F.; Topliss, J. G. QSAR Model for Drug Human Oral Bioavailability. *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 2575-2585.
184. Andrews, C. W.; Bennett, L.; Yu, L. X. Predicting Human Oral Bioavailability of a Compound: Development of a Novel Quantitative Structure-Bioavailability Relationship. *Pharm. Res.* **2000**, 17, 639-644.
185. Moda, T. L.; Carrara, A. E.; Camara, A.; Andricopulo, A. D. In Silico Predictive ADME Models for Aqueous Solubility and Inhibition of P-Glycoprotein. *In American Chemical Society 238th National Meeting, Washington*, **2009**, MEDI, p382.

186. Ertl, P.; Rohde, B.; Selzer, P. Fast Calculation of Molecular Polar Surface Area as a Sum of Fragment-Based Contributions and Its Application to the Prediction of Drug Transport Properties. *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 3714-3717.
187. Ali, J.; Camilleri, P.; Brown, M. B.; Hutt, A. J.; Kirton, S. B. In Silico Prediction of Aqueous Solubility Using Simple QSPR Models: The Importance of Phenol and Phenol-like Moieties. *J. Chem. Inf. Model* **2012**, 52, 2950-2957.
188. Li, A. P. Screening for Human ADME/Tox Drug Properties in Drug Discovery. *Drug. Discov. Today.* **2001**, 6, 357-366.
189. Wan, H. What ADME Tests Should be Conducted for Preclinical Studies?. *ADMET&DMPK.* **2013**, 1, 19-28.
190. Ekins, S.; Rose, J. In silico ADME/Tox: the State of the Art. *J. Mol. Graph Model.* **2002**, 20, 305-309.
191. Dearden, J. C. In silico Prediction of Drug Toxicity. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2003**, 17, 119-127.
192. Yang, N. Cardiac Drug Safety and hERG channel. *Trends Bio/Pharmaceutical Ind.* **2007**, 17, 30-35.
193. Sanguinetti, M. C.; Tristani-Firouzi, M. hERG Potassium Channels and Cardiac Arrhythmia. *Nature.* **2006**, 440, 463-469.
194. Raschi, E.; Ceccarini, L.; De Ponti, F.; Recanatini, M. hERG-related drug toxicity and models for predicting hERG liability and QT prolongation. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2009**, 5, 1005-1021.
195. Aronov, A. M. Predictive in silico Modeling for hERG Channel Blockers. *Expert Opin. Drug Discov. Today.* **2005**, 10, 149-155.

196. Tan, Y.; Chen, Y.; You, Q.; Sun, H.; Li, M. Predicting the Potency of hERG K⁺ Channel Inhibition by Combining 3D-QSAR Pharmacophore and 2D-QSAR Models. *J. Mol. Model.* **2012**, 18, 1023-1036.
197. Su, B. H.; Shen, M. Y.; Esposito, E. X.; Hopfinger, A. J.; Tseng, Y. J. In Silico Binary Classification QSAR Models Based on 4D-Fingerprints and MOE Descriptors for Prediction of hERG Blockage. *J. Chem. Inf. Model.* **2010**, 50, 1304-1318.
198. Ekins, S.; Crumb, W. J.; Sarazan, R. D.; Wikel, J. H.; Wrighton, S. A. Three-Dimensional Quantitative Structure-Activity Relationship for Inhibition of Human Ether-a-Go-Go-Related Gene Potassium Channel. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2002**, 301, 427-434.
199. Rayan, A.; Falah, M.; Raiyn, J.; Da'adoosh, B.; Kadan, S.; Zaid, H.; Goldblum, A. Indexing Molecules for their hERG Liability. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, 65, 304-314.
200. Wang, M.; Yang, X.; Xue, Y. Identifying hERG Potassium Channel Inhibitors by Machine Learning Methods. *QSAR & Comb. Sci.* **2008**, 27, 1028-1035.
201. Wang, S.; Li, Y.; Wang, J.; Chen, L.; Zhang, L.; Yu, H.; Hou, T. ADMET Evaluation in Drug Discovery. 12. Development of Binary Classification Models for Prediction of hERG Potassium Channel Blockage. *Mol. Pharm.* **2012**, 9, 996-1010.
202. Durdagi, S.; Deshpande, S.; Duff, H. J.; Noskov, S. Y. Modeling of Open, Closed, and Open-Inactivated States of the hERG1 Channel: Structural Mechanisms of the State-Dependent Drug Binding. *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, 52, 2760-2774.
203. Coi, A.; Bianucci, A. M. Combining Structure- and Ligand-based Approaches for Studies of Interactions Between Bifferent Conformations of the

hERG K⁺ channel Pore and Known Ligands. *J. Mol. Graph. Model.* **2013**, 46, 93-104.

204. Cavalli, A.; Poluzzi, E.; De Ponti, F.; Recanatini, M. Toward a Pharmacophore for Drugs Inducing the Long QT Syndrome: Insights from a CoMFA Study of hERG K⁺ Channel Blockers. *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 3844-3853.

205. Zemzemi, N.; Bernabeu, M. O.; Saiz, J.; Cooper, J.; Pathmanathan, P.; Mirams, G. R.; Pitt-Francis, J.; Rodriguez, B. Computational Assessment of Drug-induced Effects on the Electrocardiogram: from Ion Channel to Body Surface Potentials. *Br. J. Pharmacol.* **2013**, 168, 718-733.

206. Braga, R. C.; Alves, V. M.; Silva, M. F.; Muratov, E.; Fourches, D.; Tropsha, A.; Andrade, C. H. Tuning hERG Out: Antitarget QSAR Models for Drug Development. *Curr. Top. Med. Chem.* **2014**, 14, 1399-1415.

207. Zimmermann, J.; Buchdunger, E.; Mett, H.; Meyer, T.; Lydon, N. B.; Traxler, P. Phenylamino-pyrimidine (PAP) – Derivatives: a New Class of Potent and Highly Selective PDGF-receptor Autophosphorylation Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, 6, 1221-1226.

208. Lambert, G. K.; Duhme-Klair, A. K.; Morgan, T.; Ramjee M. K. The Background, Discovery and Clinical Development of BCR-ABL Inhibitors. *Drug. Discov. Today.* **2013**, 18, 992-1000.

209. Zimmermann, J.; Buchdunger, E.; Mett, H.; Meyer, T.; Lydon, N. B. Potent and Selective Inhibitors of the Abl-kinase: Phenylamino-pyrimidine (PAP) Derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, 7, 187-192.

210. Schindler, T.; Bornmann, W.; Pellicena, P.; Miller, W. T.; Clarkson, B.; Kuriyan, J. Structural Mechanism for STI-571 Inhibition of Abelson Tyrosine Kinase. *Science* **2000**, 289, 1938-1942.

211. Druker, B. J.; Tamura, S.; Buchdunger, E.; Ohno, S.; Segal, G. M.; Fanning, S.; Zimmermann, J.; Nicholas B. Lydon, N. B. Effects of a Selective inhibitor of the Abl Tyrosine Kinase on the Growth of Bcr–Abl Positive Cells. *Nat. Med.* **1996**, 2, 561 - 566.
212. Druker, B. J.; Sawyers, C. L.; Kantarjian, H.; Resta, D. J.; Reese, S. F.; Ford, J. M.; Capdeville, R.; Talpaz, M. Activity of a Specific Inhibitor of the BCR-ABL Tyrosine Kinase in the Blast Crisis of Chronic Myeloid Leukemia and Acute Lymphoblastic Leukemia with the Philadelphia Chromosome. *N. Engl. J. Med.* **2001**, 344, 1038-1042.
213. Gorre, M. E.; Mohammed, M.; Ellwood, K.; Hsu, N.; Paquette, R.; Rao, P. N.; Sawyers, C. L. Clinical Resistance to STI-571 Cancer Therapy Caused by BCR-ABL Gene Mutation or Amplification. *Science*. **2001**, 293, 876-880.
214. Melo, J. V.; Chuah, C. Resistance to Imatinib Mesylate in Chronic Myeloid Leukaemia. *Cancer Lett.* **2007**, 249, 121-132.
215. O'Hare, T.; Walters, D. K.; Stoffregen, E. P.; Jia, T.; Manley, P. W.; Mestan, J.; Cowan-Jacob, S. W.; Lee, F. Y.; Heinrich, M. C.; Deininger, M. W.; Druker, B. J. In vitro Activity of Bcr-Abl Inhibitors AMN107 and BMS-354825 against Clinically Relevant Imatinib-Resistant Abl Kinase Domain Mutants. *Cancer Res.* **2005**, 65, 4500-4505.
216. Martinelli, G.; Soverini, S.; Rosti, G.; Baccarani, M. Dual Tyrosine Kinase Inhibitors in Chronic Myeloid Leukemia. *Leukemia*. **2005**, 19, 1872–1879.
217. Azam, M.; Powers, J. T.; Einhorn, W.; Huang, W. S.; Shakespeare, W. C.; Zhu, X.; Dalgarno, D.; Clackson, T.; Sawyer, T. K.; Daley, G. Q. AP24163 Inhibits the Gatekeeper Mutant of BCR-ABL and Suppresses In vitro Resistance. *Chem. Biol. Drug. Des.* **2010**, 75, 223-227.
218. Huang, W.S.; Metcalf, C. A.; Sundaramoorthi, R.; Wang, Y.; Zou, D.; Thomas, R. M.; Zhu, X.; Cai, L.; Wen, D.; Liu, S.; Romero, J.; Qi, J.; Chen,

I.; Banda, G.; Lentini, S. P.; Das, S.; Xu, Q.; Keats, J.; Wang, F.; Wardwell, S.; Ning, Y.; Snodgrass, J. T.; L., Russian, K.; Zhou, T.; Commodore, L.; Narasimhan, N. I.; Mohemmad, Q. K.; Luliucci, J.; Rivera, V. M.; Dalgarno, D. C.; Sawyer, T. K.; Clackson, T.; Shakespeare, W. C. Discovery of 3-[2-(Imidazo[1,2-b]pyridazin-3-yl)ethynyl]-4-methyl-N-{4-[(4-methylpiperazin-1-yl)methyl]-3-(trifluoromethyl)phenyl}benzamide (AP24534), a Potent, Orally Active Pan-Inhibitor of Breakpoint Cluster Region-Abelso (BCR-ABL) Kinase Including the T315I Gatekeeper Mutant. *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 4701–4719.

219. Zhou, T.; Commodore, L.; Huang, W. S.; Wang, Y.; Thomas, M.; Keats, J.; Xu, Q.; Rivera, V. M.; Shakespeare, W. C.; Clackson, T.; Dalgarno, D. C.; Zhu, X. Structural Mechanism of the Pan-BCR-ABL Inhibitor Ponatinib (AP24534): Lessons for Overcoming Kinase Inhibitor Resistance. *Chem. Biol. Drug. Des.* **2011**, 77, 1-11.

220. Itzstein, M. V. The War Against Influenza: Discovery and Development of Sialidase Inhibitors. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2007**, 6, 967-974.

221. Itzstein, M. V.; Wu, W.; Kok, G. B.; Pegg, M. S.; Dyason, J. C.; Jin, B.; Phan, T. V.; Smythe, M. L.; White, H. F.; Oliver, S. W.; Colman, P. M.; Varghese, J. N.; Ryan, D. M.; Woods, J. M.; Bethell, R. C.; Hotham, V. J.; Cameron, J. M.; Penn, C. R. Rational Design of Potent Sialidase-based Inhibitors of Influenza Virus Replication. *Nature*. **1993**, 363, 418-423.

222. Taylor, N. R.; von Itzstein M. Molecular Modeling Studies on Ligand Binding to Sialidase from Influenza Virus and the Mechanism of Catalysis. *J. Med. Chem.* **1994**, 37, 616-624.

223. Goodford, P. J. A Computational Procedure for Determining Energetically Favorable Binding Sites on Biologically Important Macromolecules. *J. Med. Chem.* **1985**, 28, 849-857.

224. Brooks, B. R.; Bruccoleri, R. E.; Olafson, B. D.; States, D. J.; Swaminathan, S.; Karplus, M. CHARMM: A Program for Macromolecular Energy, Minimization, and Dynamics Calculations. *J. Comp. Chem.* **1983**, 4, 187-217.
225. Humphrey, W. ; Dalke, A. ; Schulten, K. VMD: Visual Molecular Dynamics. *J. Mol. Graph. Model.* **1996**, 14, 33-38.
226. Sanner, M. F. Python: A Programming Language for Software Integration and Development. *J. Mol. Graph. Model.* **1999**, 17, 57-61.
227. Dunbrack, R. L. Jr. Rotamer Libraries in the 21st Century. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2002**, 12, 431-440.
228. Kubinyi, H. Hansch Analysis and Related Approaches. VCH: New York. 1993.
229. Dewar, M. J. S.; Zoebisch, E. G.; Healy, E. F.; Stewart, J. J. Development and use of Quantum Mechanical Molecular Models. 76. AM1: a New General Purpose Quantum Mechanical Molecular Model. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 3902-3909.
230. Braga, R. C.; Alves, V. M.; Silva, M. F. B.; Muratov, E.; Fourches, D.; Lião, L. M.; Tropsha, A.; Andrade, C. H. Pred-hERG: A Novel web-Accessible Computational Tool for Predicting Cardiac Toxicity. *Mol. Inform.* **2015**, 34, 698–701.
231. Cocco, L.; Roth, B.; Temple, C. Jr.; Montgomery, J. A.; London, R. E.; Blakley, R. L.; Protonated State of Methotrexate, Trimethoprim, and Pyrimethamine Bound to Dihydrofolate Reductase. *Arch. Biochem. Biophys.* **1983**, 226, 567-577.
232. Bennett, B.; Langan, P.; Coates, L.; Mustyakimov, M.; Schoenborn, B.; Howell, E. E.; Dealwis, C. Neutron Diffraction Studies of Escherichia coli

Dihydrofolate Reductase Complexed with Methotrexate. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2006**, 103, 18493–18498.

233. Lam, T.; Hilgers, M. T.; Cunningham, M. L.; Kwan, B. P.; Nelson, K. J.; Brown-Driver, V.; Ong, V.; Trzoss, M.; Hough, G.; Shaw, K. J.; Finn, J. Structure-Based Design of New Dihydrofolate Reductase Antibacterial Agents: 7-(Benzimidazol-1-yl)-2,4-diaminoquinazolines. *J. Med. Chem.* **2014**, 57, 651-668.

234. Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. Artmed: Porto Alegre, 2014.

235. Schop, H.; Wiese, M.; Cordes, H. P.; Seydel, J. K. Partial Resistance of *E. coli* Mutants Against 2,4-diamino-5-benzylpyrimidines by Interactions with Bacterial Membrane Lipopolysaccharides. Derivation of Quantitative Structure–binding Relationships. *Eur. J. Med. Chem.* **2000**, 35, 619-634.

236. Girgis, A. S.; Stawinski, J.; Ismail, N. S. M.; Farag, H. Synthesis and QSAR Study of Novel Cytotoxic spiro[3H-indole-3,20(10H)-pyrrolo[3,4-c]pyrrole]-2,30,50(1H,20aH,40H)-triones. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, 47, 312-322.

237. Nadendla, R. R. *Principles of Organic Medicinal Chemistry*. New Age International: New Delhi, 2005.

238. Thomas, G. *Fundamentals of Medicinal Chemistry*. Wiley: Chichester, 2003.

239. Harris, N. V.; Smith, C.; Bowden, K. Antifolate and Antibacterial Activities of 6-substituted 2,4-diaminoquinazolines. *Eur. J. Med. Chem.* **1992**, 27, 7-18.

240. Verma, R. P.; Hansch, C. QSAR Modeling of Taxane Analogues Against Colon Cancer. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, 45, 1470-1477.

241. Hansch, C.; Verma, R. P. Larvicidal Activities of Some Organotin Compounds on Mosquito Larvae: A QSAR Study. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, 44, 260-273.

242. Herrera, J. M.; Zunino, M. P.; Dambolena, J. S.; Pizzolitto, P.; Ganán, N. A.; Lucini, E. I.; Zygadlo, J. A. Terpene Ketones as Natural Insecticides Against *Sitophilus zeamais*. *Ind. Crop. Prod.* **2015**, 70, 435-442.
243. Sharma, A.; Luxami, V.; Paul, K. A Purine-benzimidazole Hybrids: Synthesis, Single Crystal Determination and in vitro Evaluation of Antitumor Activities. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, 93, 414-422.
244. Flieger, J.; Tatarczak-Michalewska, M.; Wujec, M.; Pitucha, M.; Świeboda, R. RP-HPLC Analysis and in vitro Identification of Antimycobacterial activity of Novel Thiosemicarbazides and 1,2,4-triazole Derivatives. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2015**, 107, 501-511.
245. Veerasamy, R.; Rajak, H.; Jain, A.; Sivadasan, S.; Varghese, C. P.; Agrawal, R. K. Validation of QSAR Models - Strategies and Importance. *Int. J. Drug Des. Discov.* **2011**, 2, 511-519.
246. Roy, P. P.; Paul, S.; Mitra, I.; Roy, K. On Two Novel Parameters for Validation of Predictive QSAR Models. *Molecules.* **2009**, 14, 1660-1701.
- 247 Hou, T.; Wang, J.; Zhang, W.; Xu, X. ADME Evaluation in Drug Discovery. 7. Prediction of Oral Absorption by Correlation and Classification. *J. Chem. Inf. Model.* **2007**, 47, 208-218.